

Calciumdynamik in T-Lymphozyten

– Modell zur Anwendung in pharmakologischen Studien

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Christine Dorothee Schmeitz
aus Karlsruhe

1. Referent: Professor Dr. Michael Meyer-Hermann
2. Referent: Professor Dr. Martin Korte
eingereicht am: 29.09.2014
mündliche Prüfung (Disputation) am: 02.02.2015

Druckjahr 2015

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikation

Schmeitz, C., Hernandez-Vargas, E.A., Fliegert, R., Guse, A.H. & Meyer-Hermann, M. (2013) A mathematical model of T lymphocyte calcium dynamics derived from single transmembrane protein properties. *Front. Immunol.* 4:277.
doi:10.3389/fimmu.2013.00277.

Tagungsbeiträge

Schmeitz, C., Hernandez-Vargas, E.A., Fliegert, R., Guse, A.H. & Meyer-Hermann, M. T-cell Electrophysiology Dynamics (Poster). 15th International Congress of Immunology. Milan, Italy (2013).

Schmeitz, C., Meyer-Hermann, M. Mathematical modeling of T-cell Electrophysiology (Talk). 6th German Meeting on Immune Regulation. Berlin-Schmöckwitz, Germany (2012).

Schmeitz, C., Meyer-Hermann, M. Modeling approach to T cell Electrophysiology (Poster). 8th European Conference on Mathematical and Theoretical Biology. Krakow, Poland (2011).

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Professor Dr. Michael Meyer-Hermann für die Überlassung des Themas und insbesondere für die umfassende wissenschaftliche und persönliche Unterstützung während aller Phasen meiner Arbeit.

Für die Übernahme des Koreferats bin ich Herrn Professor Dr. Martin Korte dankbar sowie Herrn Professor Dr. Dieter Jahn für den Vorsitz bei meiner Disputation.

Bei Herrn Professor Dr. Christian Kurts, Herrn Professor em. Dr. Volker Herzog und Herrn Professor Dr. Ingo Schmitz möchte ich mich ganz besonders für die anregenden wissenschaftlichen Gespräche und hilfreichen Diskussionen bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Professor Dr. Dr. Andreas Guse und bei Herrn Dr. Ralf Fliegert für die interessanten Erkenntnisse hinsichtlich neuer Signalmoleküle sowie bei Herrn Professor Dr. Lars Pape und Frau Dr. Thurid Ahlenstiel, die mir bei allen Fragen zur Transplantationsmedizin weiterhelfen konnten.

Mein herzlicher Dank gilt auch Herrn Privatdozent Dr. Michael Becker sowie Herrn Professor Dr. Konstantin Wewetzer.

Allen Mitarbeitern und Doktoranden der Abteilung für System-Immunologie des Helmholtz-Zentrums für Infektionsforschung danke ich für die gute Zusammenarbeit und ihre Hilfsbereitschaft, insbesondere Herrn Dr. Esteban Hernandez-Vargas, Herrn Dr. Sebastian Binder und Herrn Dr. Harald Kempf.

Für die vielen hilfreichen Gespräche und das Korrekturlesen meiner Arbeit möchte ich mich herzlich bei Frau Dipl.-Biol. Stephanie Vorwerk und Herrn Dr. Matthias Stehr bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt nicht zuletzt meinem Ehemann, meinen Eltern und meiner Oma für ihre weitreichende Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| I ZIEL der ARBEIT | 1 |
| II EINLEITUNG | 3 |
| 1 Calcium als zentraler Signalüberträger..... | 3 |
| 1.1 Evolution der Signaltransduktion durch Calcium..... | 3 |
| 1.2 Calcium im Organismus..... | 4 |
| 1.2.1 Calciumhaushalt des Menschen..... | 4 |
| 1.2.2 Funktion des Calciums im Organismus..... | 5 |
| 2 Calcium als Transmitter im Immunsystem..... | 6 |
| 2.1 T-Lymphozyten im Zentrum der Immunantwort..... | 6 |
| 2.1.1 Bedeutung der T-Lymphozyten für das Immunsystem..... | 6 |
| 2.1.1.1 T-Lymphozyten und Transplantatabstoßung..... | 6 |
| 2.1.2 Entwicklung der T-Lymphozyten..... | 7 |
| 2.1.3 Antigenerkennung und T-Zell-Aktivierung..... | 8 |
| 2.1.4 Zytokin-Sezernierung und Immunantwort..... | 8 |
| 2.2 Calcium in T-Lymphozyten und Signaltransduktion..... | 9 |
| 2.2.1 Kanäle und Pumpen in der T-Zelle generieren das Calciumsignal..... | 9 |
| 2.2.2 „Store-Operated Calcium Entry“ (SOCE)..... | 12 |
| 2.2.3 Calciumsignal und Immunreaktion..... | 14 |
| 2.2.3.1 Wirkungen einer Erhöhung der Calciumkonzentration..... | 15 |
| 3 Calciumdynamik in T-Lymphozyten..... | 17 |
| 3.1 Oszillierendes Calciumsignal..... | 17 |
| 3.2. Biphasisches Calciumsignal..... | 20 |
| 4 Modellierung der Calciumdynamik in T-Zellen..... | 21 |
| 4.1 Calcium-Modelle..... | 21 |
| 4.1.1 Modell der Calciumdynamik an der immunologischen Synapse..... | 21 |
| 4.1.2 Modell des „Store-Operated Calcium Entry“..... | 22 |
| 4.2 Vorteile des neu entwickelten Calciumdynamik-Modells..... | 24 |
| 4.2.1 Experimentelle Grundlagen..... | 24 |
| 4.2.2 Realisierung von Einzelkanal-Charakteristika..... | 25 |
| 4.2.3 Physiologische Repräsentation des SOCE..... | 26 |
| 4.2.4 Berücksichtigung der Dichten der Transmembranproteine..... | 27 |

| | |
|--|----|
| III METHODEN..... | 28 |
| 1 Technische Grundlagen des Calciumdynamik-Modells der T-Zelle..... | 28 |
| 1.1 Modellierung mit Differentialgleichungen..... | 28 |
| 1.1.1 Elektrophysiologie als Grundlage..... | 28 |
| 1.1.2 Mathematische Umsetzung des T-Zell-Modells..... | 30 |
| 1.2 Modellansatz und Annahmen..... | 31 |
| 2 Calciumdynamik-Modell der T-Zelle..... | 34 |
| 2.1 Calciumdynamik im Zytosol..... | 34 |
| 2.2 Calciumdynamik im ER..... | 35 |
| 2.3 IP ₃ -Dynamik..... | 36 |
| 2.4 Membranpotential und Umkehrpotential..... | 37 |
| 2.5 T-Zell-Geometrie..... | 38 |
| 2.5.1 Volumen des Zytosols und Berechnung der Zelloberfläche..... | 39 |
| 2.5.2 Oberfläche des ER..... | 40 |
| 2.5.3 T-Zell-Größe und Volumen des ER..... | 40 |
| 2.6 Transmembranproteine..... | 42 |
| 2.6.1 „Calcium-Release Activated Channel“ (CRAC)..... | 42 |
| 2.6.1.1 Leitfähigkeit des CRAC..... | 42 |
| 2.6.1.2 Rekrutierung der CRAC..... | 42 |
| 2.6.1.3 Dichte der CRAC in der Plasmamembran..... | 43 |
| 2.6.1.4 Zeitlicher Rahmen der CRAC-Rekrutierung..... | 43 |
| 2.6.2 Inositoltrisphosphat-Rezeptor (IP ₃ R)..... | 44 |
| 2.6.2.1 Öffnungswahrscheinlichkeit des IP ₃ R | 44 |
| 2.6.2.2 Calciumstrom aus dem ER durch den IP ₃ R..... | 46 |
| 2.6.2.3 Dynamik der Aktivierung und Inaktivierung des IP ₃ R..... | 47 |
| 2.6.2.4 Aktivierungszeit des IP ₃ R..... | 47 |
| 2.6.2.5 Inaktivierungszeit des IP ₃ R..... | 47 |
| 2.6.2.6 Dichte der IP ₃ -Rezeptoren in der ER-Membran..... | 47 |
| 2.6.3 Plasmamembran-Calcium-ATPase (PMCA)..... | 48 |
| 2.6.3.1 Umsetzungsrate der PMCA und maximaler Calciumstrom..... | 48 |
| 2.6.3.2 Calciumabhängige Aktivierung der PMCA..... | 48 |
| 2.6.3.3 Abhängigkeit der PMCA von Calmodulin..... | 48 |
| 2.6.3.4 Verzögerung der PMCA-Aktivierung..... | 49 |

| | |
|--|----|
| 2.6.3.5 Dichte der PMCA-Pumpen in der Plasmamembran..... | 49 |
| 2.6.4 Sarkoendoplasmatische Retikulum-Calcium-ATPase (SERCA)..... | 49 |
| 2.6.4.1 Umsetzungsrate der SERCA und maximaler Calciumstrom..... | 50 |
| 2.6.4.2 Calciumabhängige Aktivierung der SERCA..... | 50 |
| 2.6.4.3 Dichte der SERCA-Pumpen in der ER-Membran..... | 50 |
| 2.7 Gleichgewichtszustand („steady state“)..... | 50 |
| 2.8 Parameteranpassung („fitting“)..... | 51 |
| IV ERGEBNISSE..... | 54 |
| 1 Biphasisches Calciumsignal im Modell..... | 54 |
| 1.1 Stimulation des T-Zell-Rezeptors bei extrazellulärem Calcium..... | 54 |
| 1.1.1 IP ₃ R-Eigenschaften beeinflussen biphasisches Calciumsignal..... | 55 |
| 1.1.2 Analyse der Calciumströme mit dem Modell..... | 57 |
| 1.1.3 Dichte der CRAC ist entscheidend für Calciumsignal..... | 60 |
| 1.2 Stimulation der T-Zelle in calciumfreier Umgebung..... | 61 |
| 1.2.1 Leerung des ER-Calciumspeichers verursacht Calciumpeak..... | 63 |
| 1.2.2 Leerung des ER-Calciumspeichers bedingt IP ₃ -Dynamik..... | 65 |
| 1.2.3 Rekrutierung der CRAC muss nicht zu Calciumeinstrom führen..... | 65 |
| 1.3 PMCA- und SERCA-Blockierung ohne extrazelluläres Calcium..... | 67 |
| 1.3.1 Analyse der beteiligten Transmembranproteine am Calciumausstrom..... | 68 |
| 1.3.2 Modell legt CRAC-Beteiligung am Calciumausstrom nahe..... | 70 |
| 1.3.3 IP ₃ -Dynamik durch erhöhte Calciumkonzentration..... | 71 |
| 1.4 Stimulation der T-Zelle bei gleichzeitiger PMCA-Blockierung..... | 71 |
| 1.4.1 CRAC als Gegenspieler zur PMCA..... | 71 |
| 1.4.2 Geringe Zunahme der CRAC-Dichte bei PMCA-Blockierung..... | 72 |
| 2 Modellerweiterung und elektrophysiologischer Ansatz..... | 75 |
| V DISKUSSION..... | 77 |
| 1 Calciumdynamik im Modell versus Experiment..... | 77 |
| 1.1 Konzeption des Calciumdynamik-Modells auf experimenteller Basis..... | 77 |
| 1.1.1 Verwendung experimentell bestimmter Parameter im Modell..... | 78 |
| 1.1.2 Berücksichtigung räumlicher Gegebenheiten..... | 79 |
| 1.1 Stimulation des T-Zell-Rezeptors bei extrazellulärem Calcium..... | 80 |
| 1.2 Stimulation der T-Zelle in calciumfreier Umgebung..... | 81 |
| 1.3 PMCA- und SERCA-Blockierung ohne extrazelluläres Calcium..... | 83 |

| | |
|---|-----|
| 1.3.1 Calciumströme bei Blockierung der PMCA..... | 83 |
| 1.3.2 Erlaubt der CRAC einen Calciumausstrom?..... | 84 |
| 1.4 Stimulation der T-Zelle bei gleichzeitiger PMCA-Blockierung | 85 |
| 2 Elektrophysiologischer Modellansatz..... | 86 |
| 2.1 Integration zusätzlicher Transmembranproteine..... | 86 |
| 2.1.1 Erweiterung des Modells um zwei Calcium- sowie Natrium-Kanäle..... | 86 |
| 2.1.1.1 Ryanodin-Rezeptor (RyR)..... | 86 |
| 2.1.1.2 „Transient Receptor Potential Melastatin 4“ (TRPM4)..... | 87 |
| 2.1.2 Kaliumkanäle zum Ausgleich des depolarisierten Membranpotentials..... | 87 |
| 2.1.2.1 Spannungsabhängiger Kaliumkanal ($K_v1.3$) | 87 |
| 2.1.2.2 Calciumabhängiger Kaliumkanal ($K_{Ca3.1}$)..... | 88 |
| 2.1.3 Berücksichtigung zusätzlicher Ionenpumpen..... | 88 |
| 2.1.3.1 Natrium-Kalium-ATPase (NKA)..... | 88 |
| 2.1.3.2 Natrium-Calcium-Pumpe (NaCa)..... | 89 |
| 2.2 Berücksichtigung der Elektrophysiologie..... | 90 |
| VI AUSBLICK..... | 91 |
| 1 Pharmakologische Relevanz des Calciumdynamik-Modells..... | 91 |
| 1.1 Bedeutung des CRAC für Transplantationen..... | 92 |
| 1.2 Immunerkrankungen aufgrund abnormer CRAC-Funktion..... | 93 |
| 2 Transplantationsimmunologie..... | 94 |
| 2.1 Verlauf einer Transplantation..... | 94 |
| 2.2 Transplantatabstoßung..... | 94 |
| 2.3 Pharmakotherapie der Transplantatabstoßung..... | 95 |
| 2.3.1 Therapie mit Immunsuppressiva..... | 95 |
| Behandlungsschema..... | 95 |
| Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin..... | 96 |
| 2.3.2 Immunmodulation mit CRAC-Blockern..... | 97 |
| 2.3.3 CRAC-Blocker-Tests mit einem pharmakologischen Modell..... | 100 |
| VII LITERATURVERZEICHNIS..... | 101 |
| VIII ABBILDUNGSVERZEICHNIS..... | 123 |
| IX ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... | 124 |
| X ANHANG..... | 125 |

I ZIEL der ARBEIT

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wird die Calciumdynamik in einer T-Zelle mithilfe eines Modellsystems untersucht. Das mathematische Modell der T-Zelle enthält alle relevanten Calciumkanäle sowie Calciumpumpen und berücksichtigt ihre jeweiligen Dichten in den Membranen. Bezüglich der räumlichen Gegebenheiten werden die Transmembranproteine in der Plasmamembran sowie in der Membran des Kompartiments Endoplasmatisches Retikulum (ER) dargestellt.

Das Ziel der Modellierung ist die Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Veränderung der Calciumkonzentration im Zytosol und im ER in Folge einer immunologischen Aktivierung der T-Zelle. Das Modell basiert auf biophysikalischen und pharmakologischen Parametern aus der Literatur. Die Beobachtung der Calciumdynamik wird durch mathematische Implementierung der physiologischen Parameter in ein Differentialgleichungssystem ermöglicht. Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte *in silico*-Calciumdynamik-Modell ist mit Experimenten validierbar, die unabhängig von denjenigen Versuchen sind, aus denen die Parameter bezogen werden. Das Modell steht im Kontext bereits existierender Calcium-Modellierungen (Marhl et al., 1997; Kowalewski et al., 2006; Meyer-Hermann, 2007; Martin et al., 2012), verfügt jedoch über zwei Besonderheiten, die für eine physiologische Darstellung des T-Lymphozyten und damit für die realistische Simulation der Calciumdynamik entscheidend sind: Erstens charakterisieren spezifische Einzelkanal-Eigenschaften die Transmembranproteine und zweitens werden die Dichten der Calciumkanäle und -pumpen in den Membranen separat berücksichtigt (nach Meyer-Hermann, 2007; Schmitz et al., 2013).

Das hier vorgestellte Calciumdynamik-Modell der T-Zelle kann in pharmakologischen *in silico*-Studien zur Untersuchung von Substanzen aus dem Bereich der Immunsuppressiva verwendet werden. Eine Anwendungsmöglichkeit des Modells könnte dabei in der Erforschung von Optionen bei der Therapie der Transplantatabstoßung liegen (Feske, 2007). Die T-Zellen, für die das Calciumdynamik-Modell implementiert ist, spielen eine zentrale Rolle bei der Immunreaktion des Transplantat-Empfängers gegenüber dem Spenderorgan (Breidenbach und Banas, 2011). In diesem Kontext ist die intrazelluläre Calciumdynamik in T-Lymphozyten von besonderer klinischer Bedeutung (Putney, 2001; Feske, 2007; Parekh, 2010).

Im Fokus der pharmakologischen Forschung befinden sich derzeit Antagonisten des „Calcium-Release Activated Channel“ (CRAC) (Feske, 2007; Derler et al., 2013). Der CRAC befindet sich in der Plasmamembran und sorgt durch den Einstrom von Calcium

für die Aufrechterhaltung des Calciumsignals und die Induktion der T-Zell-Aktivierung (Aussel et al., 1996; Braun et al., 2001; Prakriya und Lewis, 2001). Wird der Kanal durch CRAC-Antagonisten inhibiert, kann kein Calciueinstrom in die T-Zelle erfolgen und deren Aktivierung sowie die daraus resultierende Immunantwort wird verhindert. Eine Weiterentwicklung des Calciumdynamik-Modells, aufbauend auf den bisher entwickelten Simulations-Protokollen, kann zur Analyse potentieller CRAC-Antagonisten verwendet werden. Der Einfluss der Testsubstanzen auf die Calciumkonzentration im Zytosol sowie im ER ließe sich *in silico* beobachten und würde – ergänzend zu den *in vitro*-Untersuchungen – Aufschluss über den Aktivierungszustand der T-Zelle und damit über das Wirkpotential des getesteten CRAC-Blockers geben.

Um die Anwendung des Calciumdynamik-Modells bei der Erforschung neuer Immunmodulatoren zur Therapie der Transplantatabstoßung zu ermöglichen, bedarf es eines komplexen Modells. Das hier vorgestellte Grundmodell zur Calciumdynamik in T-Zellen kann in diesem Zusammenhang als Basis für weitere Forschungsarbeiten herangezogen werden.

Im Folgenden wird das Calciumdynamik-Modell der T-Zelle vorgestellt und in den immunologischen Kontext eingeordnet. Dabei wird auf den Stellenwert des Calciums als „second messenger“ in der Signaltransduktion Bezug genommen (Parekh und Putney, 2005). Abschließend werden die klinischen und pharmakologischen Gegebenheiten, für die das erarbeitete Modell relevant ist, diskutiert.

II EINLEITUNG

1 Calcium als zentraler Signalüberträger

1.1 Evolution der Signaltransduktion durch Calcium

Alle Metazoen besitzen in ihren Zellen Calciumkanäle (Case et al., 2007; Cai, 2008; Plattner und Verkhratsky, 2013). Von zentraler Bedeutung sind sowohl die Calciumkanäle in der Plasmamembran als auch die intrazellulären „Calcium-Release Channels“, darunter der Inositoltrisphosphat-Rezeptor in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) (Berridge et al., 1998; Berridge et al., 2000; Clapham, 2007; Cai, 2008). Diese Kanäle sind an der Dynamik sowohl globaler als auch lokaler Calciumsignale in der Zelle beteiligt (Plattner und Verkhratsky, 2013). Die evolutionären Ursprünge der Calciumkanäle finden sich bereits bei den Prokaryoten (Ladenburger et al., 2006; Cai, 2008; Ladenburger und Plattner, 2011; Plattner und Verkhratsky, 2013). Aufgrund der Zusammensetzung des präbiotischen Ozeans war der Ablauf urzeitlicher biochemischer Prozesse und prokaryotischer Lebensvorgänge vor 3,5 Millionen Jahren von einer Umgebung mit niedrigem Calciumgehalt geprägt (Kazmierczak et al., 2013). Als die Atmosphäre sich veränderte, stieg die Calciumkonzentration in den Ozeanen an (Kazmierczak et al., 2013; Plattner und Verkhratsky, 2013). Die Prokaryoten, die sich an den ursprünglich niedrigen Calciumgehalt ihrer Umgebung angepasst hatten, entwickelten Mechanismen zur Aufrechterhaltung ihrer Calciumhomöostase (Case et al., 2007; Kazmierczak et al., 2013). Aquaporine, Calciumkanäle und -pumpen sowie calciumbindende Proteine im Zytosol sorgten dafür, dass die Calciumkonzentration in der Prokaryotenzelle unterhalb von 100 nM blieb (Gangola und Rosen, 1987; Case et al., 2007; Kazmierczak et al., 2013).

In der frühen Evolution der Eukaryoten wurde Calcium zu einem zentralen Signaltransmitter und vermittelte Sekretionsvorgänge sowie die Zellteilung (Berridge et al., 2000; Clapham, 2007). Entscheidend für diese eukaryotische Entwicklung war das Vorhandensein calciumspeichernder Organellen, die – umgeben von einer eigenen Zellmembran und unter Ausbildung eines Membranpotentials – einen Calciumgradienten zwischen den Zellkompartimenten und dem Zytosol ermöglichten (Case et al., 2007; Plattner und Verkhratsky, 2013). Die Herkunft der intrazellulären Kompartimente bleibt umstritten, ein populärer Erklärungsansatz im Zusammenhang mit den Mitochondrien ist die Endosymbiontentheorie (Sagan, 1967). Die Mitochondrien, aber auch das ER, das durch Invaginationen der Plasmamembran entstanden sein könnte, stellten bereits bei

den evolutionär frühen Eukaryoten einen bedeutenden Calciumspeicher dar (Sagan, 1967). In den Membranen der Kompartimente befanden sich Transmembranproteine, die eine intrazelluläre Calciumdynamik ermöglichten (Sagan, 1967; Case et al., 2007; Plattner und Verkhratsky, 2013). Die Protozoen *Dictyostelium discoideum* und *Paramecium tetraurelia* besaßen bereits vor 850 Millionen Jahren integrale Ionenkanäle, Transporter und Pumpen (Plattner und Klauke, 2001; Allan und Fischer, 2009). Bei *Paramecium tetraurelia* finden sich 34 verschiedene „Calcium-Release Channel“ (Plattner und Klauke, 2001). Diese steuern zentrale Lebensvorgänge: die Fortbewegung mithilfe von Cilien, die Nahrungsaufnahme mit anschließender phagozytotischer Verdauung sowie die Osmoregulation und die Ausscheidung des überschüssigen Wassers (Plattner und Klauke, 2001; Plattner und Verkhratsky, 2013).

Die Metazoen entwickelten in der Evolution Mechanismen zur differenzierten Calciumregulation (Case et al., 2007; Cai, 2008; Plattner und Verkhratsky, 2013). Calcium wurde zum ubiquitären Informationsträger und erfüllte in einer Vielfalt spezialisierter Strukturen eine koordinierende und regulative Funktion (Case et al., 2007; Cai, 2008).

Zusammen mit anderen Transmittern ist Calcium als „second messenger“ in eukaryotischen Organismen, von den Protozoen bis zum Menschen, in ein hochentwickeltes Signalnetzwerk zur Steuerung essentieller Lebensvorgänge eingebunden (Case et al., 2007).

1.2 Calcium im Organismus

1.2.1 Calciumhaushalt des Menschen

Der menschliche Organismus verfügt über einen Anteil von 1,5% Calcium in gebundener und freier Form und enthält damit etwa 1 kg Calcium (Endo, 2006). Davon sind 99% als Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) in der Knochenmatrix und in den Zähnen gespeichert (Endo, 2006). Das verbleibende 1% des Calciums verteilt sich auf den Intra- und Extrazellulärraum und wird überwiegend durch Proteine, zum Beispiel das Calmodulin, gebunden (Persechini und Cronk, 1999; Mogami et al., 1999; Endo, 2006). Die Bindung des Calciums an das Protein erfolgt über die Sauerstoff-Atome der Carboxylat- und Carbonylgruppen der Peptidbindungen (Valeyev et al., 2008). Als Elektrolyt im Blutplasma mit einer Konzentration von etwa 0,1 mg/ml spielt Calcium neben anderen Ionen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des osmotischen Gleichgewichts der Blutflüssigkeit sowie als Gerinnungsfaktor bei der Hämostase (Hilgard, 1973; Hazari et al., 2012).

Der Tagesbedarf an Calcium liegt bei etwa 1 g (Duggin et al., 1974; Taylor und Curhan, 2013). Der Calciumhaushalt unterliegt einer hormonellen Kontrolle in Form eines negativen Rückkopplungssystems (Collip, 1925; Cameron, 1967). Das Schilddrüsenhormon Calcitonin senkt den Calciumspiegel im Blut, sobald der Plasmawert oberhalb von 0,1 mg/ml liegt (Copp und Cheney, 1962). Wird Calcitonin ausgeschüttet, kommt es zur Einlagerung überschüssigen Calciums in die Osteoblasten der Knochen, gleichzeitig wird die Calcium-Aufnahme im Darm vermindert und die Reabsorption von Calcium in den Nieren reduziert (Copp und Cheney, 1962; Cameron, 1967). Das Parathyrin, auch Parathormon genannt, wirkt antagonistisch und wird in Folge einer Senkung der Blutplasma-Calciumkonzentration von den Nebenschilddrüsen abgegeben (Copp und Cheney, 1962; Copp, 1964). Das Parathormon agiert zusammen mit der aktiven Form des Vitamin D (Harris und Innes, 1930; Albright und Sulkowitch, 1938). Zusammen induzieren sie die Steigerung der Calciumaufnahme aus dem Darm sowie die verstärkte Calcium-Reabsorption in den Nieren (Kleemann und Bernstein, 1961). Zudem stimuliert das Parathyrin die Freisetzung des Calciums aus der Knochenmatrix und bewirkt, dass Osteoklasten das eingelagerte Calcium abbauen und es ins Blut sezerniert werden kann (Collip, 1925; Rasmussen, 1961). Starke Calciummangelzustände können zu einem Abbau der Knochenstabilität führen und Osteoporose verursachen (Jaffe et al., 1932).

1.2.2 Funktion des Calciums im Organismus

Calcium besitzt eine wesentliche Funktion bei der Regulation von Immunzellen (Partiseti et al., 1994; Lewis, 2001; Parekh und Putney, 2005; Gauld et al., 2005; McCarl et al., 2010; Feske, 2011). Zudem spielt Calcium eine zentrale Rolle bei der Signaltransduktion in Neuronen (Penner und Neher, 1988). Es wird als Auslöser der synaptischen Exozytose von Neurotransmittern und zur Weiterleitung neuronaler Signale benötigt (Feldberg und Gaddum, 1934; Penner und Neher, 1988). Calcium ist auch an der Muskelkontraktion beteiligt und wird zur Innervierung der Muskelzelle und für die Weiterleitung des Aktionspotentials benötigt (Ringer, 1883; Locke, 1894; Harvey und MacIntosh, 1940; Babsky und Minajev, 1946; Ebashi et al., 1967; Wakabayashi und Ebashi, 1968). Als Bestandteil des Blutplasmas ist Calcium ein Cofaktor bei der Agglutination der Thrombozyten (Endo, 2006).

2 Calcium als Transmitter im Immunsystem

In der vorliegenden Arbeit geht es um die Calciumdynamik in T-Lymphozyten. Die Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration ist eine Folge der Aktivierung der T-Zellen aufgrund einer Infektion oder als Reaktion auf ein Transplantat (Lewis, 2001; Parekh und Putney, 2005; Feske, 2007; Breidenbach und Banas, 2011; Kumbala und Zhang, 2013).

2.1 T-Lymphozyten im Zentrum der Immunantwort

2.1.1 Bedeutung der T-Lymphozyten für das Immunsystem

Dem Immunsystem kommt die Aufgabe zu, den Körper vor Krankheitserregern, wie zum Beispiel Bakterien, Viren, Pilze, Parasiten, aber auch vor Toxinen und veränderten körpereigenen Zellen, darunter Tumorzellen, zu schützen (Parkin und Cohen, 2001; Romani, 2004; Finlay und Fadden, 2006). Die T-Lymphozyten sind als T-Helferzellen, T-Effektorzellen und zytotoxische T-Zellen ein zentraler Bestandteil des Immunsystems (Parkin und Cohen, 2001; Broere et al., 2011). Sie werden, wie auch die B-Lymphozyten, dem adaptiven Immunsystem zugeordnet (Parkin und Cohen, 2001). T-Zellen besitzen spezifische Rezeptoren zur Erkennung der Epitope von Antigenen und sind für die zielgerichtete Erregerbekämpfung verantwortlich (Parkin und Cohen, 2001; Medzhitov, 2007). Bei der Immunantwort spielen die Zytokine, die von T-Lymphozyten sezerniert werden, als Signalpeptide eine wichtige Rolle für die Entwicklung und Steuerung der Immunzellen (Goodbourn et al., 2000; Parkin und Cohen, 2001; Horn et al., 2005). Die Lymphozyten werden bei der Immunantwort von der angeborenen Resistenz unterstützt. Zu dieser gehören Makrophagen, natürliche Killerzellen, Mastzellen, Granulozyten und dendritische Zellen (Kobayashi et al., 2005; Zhang und Bevan, 2011; Medzhitov, 2007). Im Gegensatz zu den T-Zellen agieren die Zellen der angeborenen Resistenz unspezifisch. Sie phagozytieren Krankheitserreger und werden dabei durch das Komplementsystem ergänzt, dessen Faktoren für die Entzündungsreaktion bei einer Infektion mitverantwortlich sind (Parkin und Cohen, 2001; Finlay und Fadden, 2006).

2.1.1.1 T-Lymphozyten und Transplantatabstoßung

Die in einer Transplantation übertragenen allogenen oder xenogenen Organe und Gewebe können durch das Immunsystem als fremd erkannt und abgestoßen werden

(Breidenbach und Banas, 2011; Aktories et al., 2004). Die Immunreaktion des Empfängers auf das Spenderorgan führt ohne immunsuppressive Behandlung zur sofortigen, hyperakuten Abstoßung (Ahlenstiehl und Pape, Medizinische Hochschule Hannover, mdl. Mitt. 02/2013). Die Gefäße des Empfängerorgans werden durch eine T-Zell-vermittelte Immunreaktion attackiert (Ahlenstiehl und Pape, Medizinische Hochschule Hannover, mdl. Mitt. 02/2013; Kumbala und Zhang, 2013). Es entwickelt sich eine Endothelitis, die zu einer Mangel durchblutung des Organs führt und Organversagen verursacht (Breidenbach und Banas, 2011; Ahlenstiehl und Pape, Medizinische Hochschule Hannover, mdl. Mitt. 02/2013).

2.1.2 Entwicklung der T-Lymphozyten

Die T-Lymphozyten gehören wie die B-Lymphozyten zu den Leukozyten und entstammen als pluripotente hämatopoetische Stammzellen dem Knochenmark (Michal, 1999; Broere et al., 2011). Ein Teil dieser Vorläuferzellen verbleibt im Knochenmark und wird dort zu B-Zellen, der andere Teil wandert in den Thymus und entwickelt sich zu naiven T-Zellen (Michal, 1999; Broere et al., 2011). Die naiven T-Zellen werden in den sekundären lymphatischen Organen, den Lymphknoten und der Milz, weiter differenziert: Sie erfahren hier den ersten Kontakt mit Fremdproteinen und durchlaufen eine antigenabhängige Aktivierung zu T-Effektorzellen (Burnet, 1960; Mebius und Kraal, 2005; Broere et al., 2011). Diese klonale Selektion führt zur Reifung und Proliferation spezialisierter T-Lymphozyten-Klone (Burnet, 1960; Broere et al., 2011). Dabei werden zudem diejenigen T-Zellen ausgesondert, die nicht nur auf körperfremde Antigene, sondern irrtümlich ebenso auf körpereigene Proteine reagieren (Mebius und Kraal, 2005; Broere et al., 2011). Eine Ausnahme hiervon bilden die regulatorischen T-Zellen (Corthay, 2009; Khailaie et al., 2013). Die Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen sowie die Kontrolle und Begrenzung einer überschießenden Immunreaktion wird durch die T_{reg} , die auch als sogenannte Suppressor-T-Zellen bezeichnet werden, gewährleistet (Corthay, 2009; Khailaie et al., 2013). Es existieren verschiedene Subpopulationen, darunter die $CD4^+CD25^+T_{reg}$ (nT_{reg}), die direkt im Thymus entstehen und durch die Expression des Transkriptionsfaktors FOXP3 gekennzeichnet sind (Engel et al., 2013).

2.1.3 Antigenerkennung und T-Zell-Aktivierung

Für eine Erkennung durch die T-Lymphozyten müssen die Antigene zunächst durch antigenpräsentierende Zellen, zum Beispiel B-Zellen, dendritische Zellen oder Makrophagen, zu kurzen Peptidfragmenten aufbereitet werden (Steinman, 1991; Broere et al., 2011; Ganguly et al., 2013). Diese Antigenfragmente werden an den „Major Histocompatibility Complex“ (MHC) gebunden und können so durch den T-Zell-Rezeptor erkannt werden (Zinkernagel und Doherty, 1974). Der T-Zell-Rezeptor besteht aus einem extrazellulären, einem transmembranären und einem intrazytoplasmatischen Anteil (Michal, 1999; Wucherpfennig et al., 2010). Zur Formation des funktionellen T-Zell-Rezeptors werden Co-Rezeptoren benötigt (Wucherpfennig et al., 2010; Broere et al., 2011; García et al., 2012). Der funktionelle T-Zell-Rezeptor-Komplex kann die präsentierten Antigene erkennen und die Signaltransduktion initiieren.

Die MHC-Proteine werden auch als „Human Leucocyte Antigen“ (HLA) oder als Haupttransplantationsantigene bezeichnet (Shiina et al., 2009; García et al., 2012). Sie stellen die Strukturen des Organspenders dar, die bei einer Transplantation im Empfängerorganismus die Immunreaktion auslösen (Zinkernagel und Doherty, 1974; García et al., 2012). Es gibt zwei Klassen von MHC-Molekülen: Die MHC-I-Moleküle befinden sich auf allen kernhaltigen Körperzellen und die MHC-II-Moleküle sind nur auf antigenpräsentierenden Zellen vorhanden (Parkin und Cohen, 2001; García et al., 2012). Im Thymus wird die T-Zelle zur Proliferation und in Abhängigkeit des aktivierenden MHC-Moleküls zur Differenzierung angeregt: MHC-I fördert die Ausbildung des CD8⁺-Co-Rezeptors und damit die Entwicklung zur zytotoxischen T-Zelle, MHC-II rekrutiert den CD4⁺-Co-Rezeptor und begünstigt dadurch die Entstehung der T-Helferzelle (Wucherpfennig et al., 2010; Zhang und Bevan, 2011; García et al., 2012).

2.1.4 Zytokin-Sezernierung und Immunantwort

Werden CD4⁺-T-Helferzellen durch den Kontakt mit antigenpräsentierenden Zellen aktiviert, so synthetisieren sie Zytokine und geben diese in ihre Umgebung ab (Parkin und Cohen, 2001). Zytokine sind hydrophile Signalpeptide, die über die Bindung an Rezeptoren das Wachstum, die Differenzierung und die Apoptose von Zellen regulieren (Goodbourn et al., 2000; Parkin und Cohen, 2011; Medzhitov, 2007; Broere, 2011). Sie sind an der Entstehung von Entzündungen beteiligt und haben einen Einfluss auf die Blutgerinnung und den Blutdruck (Parkin und Cohen, 2001; Koolman und Röhm, 2003; Broere

et al., 2011). Zu den Zytokinen gehören die Interleukine (IL), die Lymphokine, die Monokine, die Chemokine, die Interferone (IFN), die Kolonie-stimulierenden Faktoren und die Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF) (Goodbourn et al., 2000; Parkin und Cohen, 2001; Medzhitov, 2007; Levy et al., 2011). Anhand der von den T-Helferzellen ausgeschütteten Zytokine werden zwei T-Zelltypen unterschieden: T-Helferzellen vom Typ 1 (Th1) sezernieren den Tumor-Nekrose-Faktor TNF- α , das Interleukin IL-2 und das Interferon IFN- γ (Goodbourne et al., 2000; Levy et al., 2011). T-Helferzellen vom Typ 2 (Th2) produzieren die Interleukine IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 (Parkin und Cohen, 2001).

Die durch die T-Helferzellen (Th2) ausgeschütteten Zytokine fördern die selektive klonale Proliferation der B-Lymphozyten, die Rezeptoren für das individuelle Erreger-Antigen besitzen (Parkin und Cohen, 2001; Broere et al., 2011). Die stimulierten B-Lymphozyten reifen zu B-Plasmazellen heran und setzen Erreger-spezifische Antikörper frei (Parkin und Cohen, 2001). Diese zirkulieren als Immunglobuline im Blut und agglutinieren Fremdproteine (Parkin und Cohen, 2001). Phagozyten und natürliche Killerzellen nehmen die Antikörper-markierten Krankheitserreger auf und bauen sie ab (Medzhitov, 2007; Zhang und Bevan, 2011).

2.2 Calcium in T-Lymphozyten und Signaltransduktion

2.2.1 Kanäle und Pumpen in der T-Zelle generieren das Calciumsignal

Bei einer Aktivierung des T-Zell-Rezeptors wird zwischen der antigenpräsentierenden Zelle und dem T-Lymphozyten eine immunologische Synapse gebildet (Lioudyno et al., 2008; Quintana et al., 2011). Nach einer T-Zell-Rezeptor-Stimulation kann eine intrazelluläre Calciumdynamik beobachtet werden (Imboden und Stobo, 1985; Putney, 1986; Zweifach und Lewis, 1993; Lewis, 2003). Das Calciumsignal, das im Zentrum der T-Zell-Aktivierung steht, ist von vielen Faktoren abhängig und unterliegt der Kontrolle von Kanälen, Pumpen und Signalmolekülen (siehe Abb. 5 in Kapitel III, 1.2).

Aus der Stimulation des T-Zell-Rezeptors resultiert die Tyrosinkinasen-Signalkaskade, in deren Verlauf die Phospholipase C aktiviert wird (Allbritton et al., 1992; Feske et al., 2012). In dem sich anschließenden Phosphatidylinositol-Signalweg wird das Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂), welches sich auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran befindet, in Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) gespalten (Berridge und Irvine, 1984; Putney, 1986; Meyer et al., 1988; Hoth et al., 2000; Parekh und Putney, 2005). Das IP₃ bindet an den Inositoltrisphosphat-Rezeptor

(IP₃R) in der Membran des ER (Imboden und Stobo, 1985; Streb et al., 1985; Meyer et al., 1988; Rizzuto et al., 2009). Zusätzlich wird der IP₃R durch Calcium stimuliert, wodurch der „Calcium-Induced Calcium Release“ (CICR) induziert wird (Berridge, 1993). Aufgrund der Aktivierung durch diese beiden Liganden erfolgt die Freisetzung von Calcium aus dem Lumen des ER durch den IP₃R in das Zytosol (Imboden und Stobo, 1985; Putney, 1986; Lewis, 2003).

Neben IP₃ und Calcium sind an der Freisetzung von Calcium aus dem ER auch die „second messenger“ zyklische ADP-Ribose (cADPR) und Nikotinsäureadenin-dinukleotidphosphat (NAADP) beteiligt (Guse et al., 1999; Guse, 2009). Beide „second messenger“ sind Liganden am Ryanodin-Rezeptor (RyR), der zur Freisetzung des Calciums aus dem ER beiträgt (Schwarzmann et al., 2002; Kunerth et al., 2004; Dammermann und Guse, 2005; Guse, 2012). Das IP₃ spielt eine wesentliche Rolle bei der initialen Stimulations-Reaktion und cADPR ist sowohl für die initiale Calciumfreisetzung als auch für die Signal-Erhaltung entscheidend (Da Silva und Guse, 2000). Dagegen gibt es auch Experimente, die auf eine Schlüsselfunktion des NAADP schließen lassen, womit die IP₃- und cADPR-initiierten Abläufe nachrangig wären (Berg et al., 2000). Die genaue zeitliche Abfolge, in welcher die „second messenger“ an die entsprechenden Rezeptoren binden und diese aktivieren, ist jedoch noch nicht ganz geklärt (Da Silva und Guse, 2000).

Bedingt durch die Abnahme der Calciumkonzentration im ER erfährt der „Calcium-Release Activated Channel“ (CRAC) in der Plasmamembran eine Stimulation (Putney, 1986; Liou et al., 2005; Luik et al., 2008). Extrazelluläres Calcium strömt durch den CRAC in die T-Zelle, wodurch das zytosolische Calciumsignal verstärkt wird (Penner und Neher, 1988; Hoth und Penner, 1993; Zweifach und Lewis, 1993). Putney erkannte die Relevanz dieses Signalweges bereits 1986 und bezeichnete den Vorgang als „Capacitative Calcium Entry“ (Putney, 1986; Putney, 1990). Später wurde die Hypothese experimentell bestätigt und in „Store-Operated Calcium Entry“ (SOCE) umbenannt (Putney und Bird, 1993; Parekh und Putney, 2005; Lewis, 2007; Feske et al., 2012). An der Aufrechterhaltung des zytosolischen Calciumsignals sind darüber hinaus noch weitere Kanäle, die sich in der Plasmamembran der T-Zelle befinden, beteiligt. Diese sorgen unter anderem für eine Stabilisierung des Membranpotentials (Kelly et al., 1991, Ishida und Chused, 1993; Grissmer et al., 1993; Feske et al., 2012). Das Membranpotential der T-Zelle liegt im Ruhezustand bei -60 mV (Ishida und Chused, 1993; Verheugen et al., 1995; Launay et al., 2004). Aufgrund des Anstiegs der Calciumkonzentration in Folge der T-Zell-Aktivierung wird es depolarisiert. Durch die zytosolische Calciumkonzentration wird der Kaliumkanal K_{Ca}3.1 aktiviert und Kalium strömt in den Extrazellulärraum (Kelly et al., 1991; Feske et

al., 2012). Damit wird eine Verminderung der Depolarisation des Membranpotentials erzielt. Zusätzlich trägt der spannungsabhängige Kaliumkanal $K_v1.3$ zur Regulation des Membranpotentials bei, indem er Kaliumionen in den Extrazellulärraum diffundieren lässt (Grissmer et al., 1993; Feske et al., 2012). Neben Calciumkanälen vom L-Typ (Grafton und Thwaite, 2001; Stokes et al., 2004) sind darüber hinaus Kanäle des Typs „Transient Receptor Potential Melastatin“ (TRP) sowie weitere Kationenkanäle und Chloridkanäle beteiligt (Feske et al., 2012). Mit dem Abklingen der T-Zell-Aktivierung kommt es zur Rückbildung des Calciumsignals und die erhöhte Calciumkonzentration im Zytosol wird durch das Ausströmen des Calciums durch die Plasmamembran-Calcium-ATPase (PMCA) ausgeglichen (Zylinska und Soszynski, 2000; Caride et al., 2001a; Bautista et al., 2002). Das ER wird durch die Sarkoendoplasmatische Retikulum-Calcium-ATPase (SERCA) wieder mit Calcium aufgefüllt (Launay et al., 1997). Der CRAC erfährt eine Inaktivierung durch negative Rückkopplung mit der hohen zytosolischen Calciumkonzentration (Zweifach und Lewis, 1995a und 1995b).

2.2.2 „Store-Operated Calcium Entry“ (SOCE)

Der Mechanismus des SOCE, über den die Information des sich leerenden Calciumspeichers an den CRAC in der Plasmamembran weitergetragen wird, war lange Zeit unklar (Lewis, 2007). Liou et al. erkannten, dass das „Stromal Interaction Molecule“ (STIM1) in der Membran des ER als Calcium-Sensor fungiert (Liou et al., 2005).

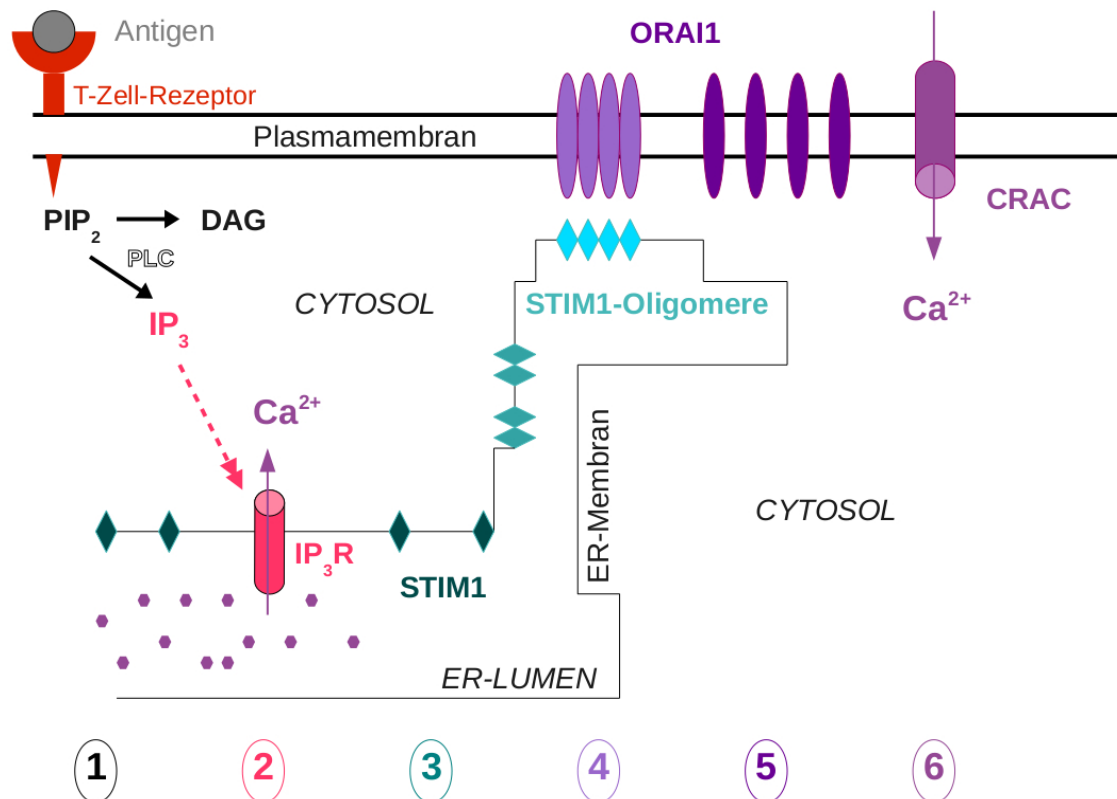


Abb. 1: „Store-Operated Calcium Entry“ (SOCE)

(1) Das Antigen bindet an den T-Zell-Rezeptor und löst eine Signalkaskade im Zytosol aus. Im Phosphatidylinositol-Phosphatweg wird neben DAG auch IP₃ aus PIP₂ durch die Phospholipase C (PLC) abgespalten. Das IP₃ aktiviert den IP₃R. **(2)** Durch den IP₃R strömt Calcium aus dem ER in das Zytosol. STIM1 fungiert als Calciumsensor und registriert die Leerung des Calciumspeichers. **(3)** Mehrere STIM1 bilden Oligomere und wandern entlang der ER-Membran in die Nähe der Plasmamembran. **(4)** Die STIM1-Oligomere rekrutieren ORAI-Proteine in der Plasmamembran. **(5)** Aus den ORAI-Proteinen wird der aktive CRAC gebildet. **(6)** Durch den CRAC kann extrazelluläres Calcium in das Zytosol einströmen.

Die STIM1-Proteine sind membrandurchspannend und besitzen eine Calcium-bindende Domäne auf der luminalen Seite des ER (Liou et al., 2005). Diese sogenannte EF-Hand-Domäne, ein spezifisches Aminosäuremotiv, hält Calcium gebunden, solange der T-Lymphozyt sich im unaktivierten Zustand befindet (Liou et al., 2005; Zhang et al., 2005). In Folge einer Stimulation des T-Zell-Rezeptors sinkt die Calciumkonzentration im ER

aufgrund des Calciumausstroms durch den IP_3R (Abb. 1). Dies geschieht entlang des Calcium-Konzentrationsgefälles zwischen dem ER-Lumen und dem Zytosol. Die Calciumkonzentration im ER-Lumen liegt bei einem Durchschnittswert von 0,4 mM (nach Feske, 2007: zwischen 0,1 mM und 0,8 mM) und im Zytosol bei 0,1 μM (Feske, 2007). Aufgrund des Sinkens der Calciumkonzentration im ER dissoziiert Calcium aus der EF-Domäne des STIM1-Proteins (Liou et al., 2005). Dies bewirkt eine Konformationsänderung des STIM1 und führt zur Oligomerisierung mehrerer STIM1-Proteine (Zhang et al., 2005; Wu et al., 2006; Luik et al., 2008). Die STIM1-Multimere wandern dann entlang der ER-Membran in Bereiche, an denen sich das ER nahe der Plasmamembran befindet (Abb. 1) (Wu et al., 2006). Dieser Vorgang wird durch Umformungen des ER unterstützt: Das ER bildet Ausläufer, die dicht mit STIM1-Molekülen besetzt sind (Shen et al., 2011). Diese ER-Ausläufer verlängern sich mit Hilfe von Mikrotubuli und gelangen so in die Nähe der Plasmamembran, ohne dabei mit dieser in direkten Kontakt zu treten (Shen et al., 2011). Die STIM1-Moleküle bilden daraufhin Cluster und rekrutieren die in der Plasmamembran befindlichen ORAI-Proteine (Luik et al., 2006). Es sind drei verschiedene ORAI-Proteine, ORAI1–3, bekannt (Hou et al., 2012). Die Rekrutierung erfolgt als gradueller Prozess: Bei einer vollständigen Aktivierung kommen acht STIM1-Moleküle auf die ORAI-Proteine, die zu einer Konformationsänderung angeregt werden und den aktiven CRAC ausbilden (Li et al., 2011; Hou et al., 2012). Der CRAC wird aus sechs ORAI-Proteinen gebildet, wobei jede dieser ORAI-Untereinheiten strukturell jeweils vier Transmembran-Helices, M1–M4, besitzt (Hou et al., 2012). Die ORAI-Proteine ordnen sich zu einem hexamerischen CRAC an, durch den das Calcium aus dem Extrazellulär-raum in das Zytosol gelangen kann (Abb. 1) (Hou et al., 2012). Dadurch, dass die Calciumkonzentration im Extrazellulär-raum bei circa 1 mM liegt und damit deutlich höher ist als im Zytosol mit 0,1 μM , ist für den Transport durch den CRAC keine Energie in Form von Adenosintriphosphat erforderlich (Feske, 2007). Das Calcium kann mittels Diffusion entlang des Konzentrationsgradienten durch den CRAC in das Zytosol einströmen (Feske, 2007; Hou et al., 2012).

Die Calcium-Spezifität des CRAC wird durch hochaffine Bindung des Calciums an einen Glutamat-Ring auf der extrazellulären Seite des Kanals bedingt (Hou et al., 2012). Dieser „Ionenfilter“ erklärt die Selektivität des CRAC und die nahezu ausschließliche Permeation des CRAC für Calcium-Ionen (Hou et al., 2012). Eine Mutation der Aminosäure Glutaminsäure zu Asparaginsäure erhöht die Kanal-Permeabilität allerdings für monovalente Ionen (Hou et al., 2012).

Mit Einsetzen des Calciumeinstroms wandern Mitochondrien an die Plasmamembran in

die Nähe des CRAC und nehmen im Bereich der Calcium-Mikrodomäne das einströmende Calcium auf (Quintana et al., 2006). Dadurch bleibt der Calciumeinstrom durch den CRAC bestehen und das lokale Calciumsignal im Bereich der immunologischen Synapse kann länger aufrechterhalten werden (Luik et al., 2006; Quintana et al., 2011; Martin et al., 2012). Das einströmende Calcium bindet an Calmodulin, ein Protein mit vier Calciumbindungsstellen und einer regulativen Funktion (Huang et al., 1981). Sind alle Stellen mit dem Liganden Calcium besetzt, so kommt es zur Komplexbildung zwischen Calmodulin und der Phosphatase Calcineurin (Hung et al., 1981; Persechini und Cronk, 1999; Aramburu et al., 2004). Das aktivierte Calcineurin dephosphoryliert den Transkriptionsfaktor „Nuclear Factor of Activated T-cells“ (NFAT) (McCaffrey et al., 1993; Hogan et al., 2003). NFAT wandert daraufhin mit Hilfe des Transportproteins Importin in den Zellkern und reguliert dort die Genexpression (Parekh, 2010).

2.2.3 Calciumsignal und Immunreaktion

Das Calciumsignal wird zur Ausbildung des Kontakts zwischen der T-Zelle und der antigenpräsentierenden Zelle benötigt (Feske, 2007). Nach erfolgter Bindung des Immunrezeptors an ein Antigen kommt es zu einem Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration (Crabtree, 1989; Feske, 2007). Dabei kooperiert Calcium mit dem „second messenger“ IP_3 (Berridge, 1993). Die Proliferation und die Differenzierung der T-Zelle wird dadurch angeregt (Crabtree, 1989; Feske, 2007). Es werden Zytokine ausgeschüttet, die Genexpression wird beeinflusst und ein Einfluss auf die Zell-Mobilität kann beobachtet werden (Feske, 2007; Cahalan und Chandy, 2009; Parekh, 2010). Das Calciumsignal spielt in T-Lymphozyten eine wichtige Rolle bei der RNA-Synthese und bei der mitotischen Zellteilung (Whitfield et al., 1968; Feske, 2007). Des Weiteren wird durch Calcium in zytotoxischen T-Zellen die Exozytose proteolytischer Granula und Perforine stimuliert (Schwarz et al., 2013). Erhöhte Calciumkonzentrationen ohne begleitende Co-Aktivierungsprozesse können zur Anergie führen, also zu einer fehlenden immunologischen Reaktion sowohl der T- als auch der B-Lymphozyten gegenüber einem Antigen (Gauld et al., 2005, Feske, 2007). Die Anergie, ursächlich bedingt und aufrechterhalten durch eine Bindung von Selbst-Antigenen im lymphatischen Gewebe, ist dabei die Voraussetzung zur Entwicklung der Immuntoleranz (Gauld et al., 2005).

Nicht nur T-Lymphozyten werden durch Calcium aktiviert. Auch die Mastzellen erfahren eine Stimulation durch Calcium und werden zur Exozytose und zur Histamin-Sezernierung

angeregt (Pearce, 1985). Dendritische Zellen können sich in Folge einer Calcium-Aktivierung aus myeloischen Vorläuferzellen entwickeln (Feske, 2007; Shumilina et al., 2011) und Makrophagen sowie Neutrophile erfahren durch das Calciumsignal eine Aktivierung ihrer Phagozytose-Fähigkeit (Kruskal und Maxfield, 1987; Feske, 2007).

2.2.3.1 Wirkungen einer Erhöhung der Calciumkonzentration

Die Wirkungen der Calciumsignale in T-Zellen können anhand ihrer Kurz- oder Langfristigkeit unterschieden werden (Feske, 2007).

Zu den kurzfristigen Folgeerscheinungen gehört die morphologische Veränderung der T-Lymphozyten (Negulescu et al., 1996; Delon et al., 1998). Ein Anstieg der Calciumkonzentration bewirkt die Bewegungsminderung und Rundung der Zellen, wodurch der Kontakt zwischen T-Zelle und antigenpräsentierender Zelle stabilisiert wird (Negulescu et al., 1996; Delon et al., 1998). Die strukturellen Umbildungen in der T-Zelle sind auf Veränderungen des Zytoskeletts und auf eine Reorganisation des Mikrotubuli-Netzwerkes zurückzuführen (Kupfer et al., 1986; Delon et al., 1998). Ebenso als kurzfristige Wirkung, bedingt durch eine Erhöhung der Calciumkonzentration, kann die Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen angesehen werden (Feske, 2007). Deren zytolytische Eigenschaft setzt kurze Zeit nach einem Kontakt mit der antigenpräsentierenden Zelle ein (Feske, 2007). Dabei kann es sich um eine Zeitdauer von nur wenigen Minuten handeln, in welcher die zytotoxischen Proteasen über eine Calcium-vermittelte Exozytose sezerniert werden (Lyubchenko, 2001).

Die langfristigen Calcium-Effekte sind die auf der Transkriptionsebene stattfindenden Prozesse (Feske, 2007). Über die Stimulation der Genexpression kann die Differenzierung naiver T-Zellen in Th1 oder Th2 angeregt werden (Dolmetsch et al., 1997; Leitenberg und Bottomly, 1999; Arrol et al., 2008). Des Weiteren wird das Wachstum (Weiss et al., 1984) und die Proliferation von T-Effektorzellen gefördert (Feske, 2007; Parekh, 2010). Aufgrund der Wirkung der Calcium-initiierten Signalkette auf die Genexpression, die durch Transkriptionsfaktoren vermittelt wird, werden Zytokine produziert (Crabtree, 1989). Diese haben einen Einfluss auf die Genexpression anderer Immunzellen (Avni und Rao, 2000).

Die Transkriptionsfaktoren, welche sich für die Umsetzung des Calciumsignals in eine veränderte Genexpression verantwortlich zeigen, sind unter anderem der „Nuclear Factor of Activated T-cells“ (NFAT) (Hogan et al., 2003; Macian, 2005), das „Cyclic-AMP Response Element-Binding protein“ (CREB), der „Nuclear Factor κ B“ (NF- κ B) und der „Myocyte-Enhancer Factor 2A“ (MEF2). Die Transkriptionsfaktoren erzielen ihre Wirkung

durch die Variation von DNA-Anbindungsmöglichkeiten und Methylierungen. Beispielsweise induziert NFAT eine Umbildung des Chromatins in der frühen Phase sich differenzierender T-Zellen (Avni und Rao, 2000; Hogan et al., 2003). Das Signal zur Translokation aus dem Zytosol in den Zellkern erhält NFAT durch Dephosphorylierung mittels der Calcium-aktivierten Phosphatase Calcineurin (Feske et al., 2007; Hogan et al., 2003). Der Vorgang wird über dynamische Veränderungen der Calciumkonzentration kontrolliert und im Fall der NFAT-vermittelten Gentranskription ist eine wiederholte Signalgebung durch Calcium erforderlich, um die angestrebte Genexpression zu bewirken (Dolmetsch et al., 1997). In diesem Zusammenhang spielt die Bindungsstärke des Antigen-Liganden an den T-Zell-Rezeptor bezüglich des Musters und der Stärke der daraus resultierenden Signaltransduktion eine entscheidende Rolle (Leitenberg und Bottomly, 1999). Das Calciumsignal wird für einige Stunden aufrecht erhalten und variiert in Amplitude, Dauer und Frequenz, wobei das Signalmuster in Abhängigkeit der zu erzielenden Genexpression unterschiedlich ist (Dolmetsch und Lewis, 1994; Feske, 2007).

Als Reaktion auf eine Aktivierung des T-Zell-Rezeptors sind unter bestimmten Bedingungen Oszillationen beobachtbar oder das Calciumsignal weist eine biphasische Form auf.

3 Calciumdynamik in T-Lymphozyten

3.1 Oszillierendes Calciumsignal

Der Entwicklung der naiven T-Zellen aus den Vorläuferzellen im Thymus geht ein oszillierendes Calciumsignal voraus, wodurch die Thymozyten in ihrer Bewegung abgebremst werden und in Kontakt mit Antigenen treten können (Bhakta et al., 2005). Diese Calcium-induzierte Umstrukturierung und Bewegungsminderung findet auch in reifen T-Lymphozyten statt (Negulescu et al., 1996; Delon et al., 1998). Nach Antigenkontakt des T-Zell-Rezeptors können bei der Signalweiterleitung Calcium-Oszillationen auftreten (Tsien et al., 1982a; Imboden und Stobo, 1985; Dolmetsch und Lewis, 1994). Die Stimulation des T-Zell-Rezeptors wird in einen Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration umgesetzt (Tsien et al., 1982a; Imboden und Stobo, 1985), um die Ausbildung der immunologischen Funktionen zu erreichen (Crabtree, 1989).

In Experimenten konnte als Reaktion auf die Aktivierung des T-Zell-Rezeptors ein oszillierendes Calciumsignal mit einer durchschnittlichen Periode von 5–60 s beobachtet werden (Abb. 2; Dolmetsch und Lewis, 1994). Die Erklärung für diesen sogenannten „zytosolischen Calcium-Oszillator“ wurde im dynamischen Gleichgewicht der sich wiederholenden Leerung und Füllung des Calciumspeichers gesucht (Berridge und Galione, 1988; Meyer und Stryer, 1988). Die Idee dabei war, dass, aufgrund der Abhängigkeit des „Oszillators“ sowohl von Calcium als auch von IP_3 , die Ursache für das Oszillieren in der wiederholten Calcium-Freisetzung durch den IP_3R mit wechselnder ER-Wiederauffüllung durch die SERCA zu finden sein müsste (Berridge und Galione, 1988; Meyer und Stryer, 1988; Berridge, 1993). Dabei wurde ein kooperatives Feedback zwischen dem IP_3R und der Phospholipase C vorausgesetzt (Meyer und Stryer, 1988). So wurde der IP_3 -aktivierte ER-Calciumspeicher als einzige Quelle und gleichzeitiger Motor des „Calcium-Oszillators“ angesehen (Imboden und Stobo, 1985). Die hypothetische Beschränkung auf den Vorgang der Speicher-Leerung und -Befüllung als alleinigen Verursacher der Calcium-Oszillationen wurde zunächst scheinbar dadurch gefestigt, dass die Entfernung des extrazellulären Calciums sich erst zeitlich versetzt auf die Oszillationen auszuwirken schien (Woods et al., 1986). Der „Calcium-Oszillator“ konnte also noch einige Zeit in Calcium-freier Umgebung weiterarbeiten (Woods et al., 1986). Dynamische Fluktuationen in der IP_3 -Konzentration wurden als Auslöser der Calcium-Oszillationen jedoch durch die Versuche von Wakui et al. ausgeschlossen (Wakui et al., 1989). In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass der Einstrom extrazellulären Calciums für die Oszillationen

von entscheidender Bedeutung ist (Lewis und Cahalan, 1989; Dolmetsch und Lewis, 1994).

Eine Aktivierung der T-Zelle durch die Leerung des ER-Calciumspeichers mit dem SERCA-Blocker Thapsigargin (TG), wie in Abbildung 2 dargestellt, führt in Abhängigkeit der extrazellulären Calciumkonzentration zu zytosolischen Calcium-Oszillationen mit variabler Amplitude und einer Periode von 90–120 s (Lewis und Cahalan, 1989; Dolmetsch und Lewis, 1994). Zu Calcium-Oszillationen kommt es, wenn Thapsigargin im Bereich bestimmter Konzentrationen eingesetzt wird. Dies ist, wie Abbildung 2 veranschaulicht, bei einer Thapsigargin-Konzentration von 15 nM zu beobachten (Dolmetsch und Lewis, 1994). Die Abbildung 3 zeigt, dass sowohl der Calciumgehalt des Speichers, als auch die Stärke des Einstroms extrazellulären Calciums, innerhalb der jeweiligen Oszillationszyklen in Abhängigkeit der Thapsigargin-Dosis schwanken (Dolmetsch und Lewis, 1994). Die resultierenden Oszillationen entsprechen, ohne zusätzliche Mitogenaktivierung, denjenigen bei einer T-Zell-Rezeptor-Stimulation (Dolmetsch und Lewis, 1994).

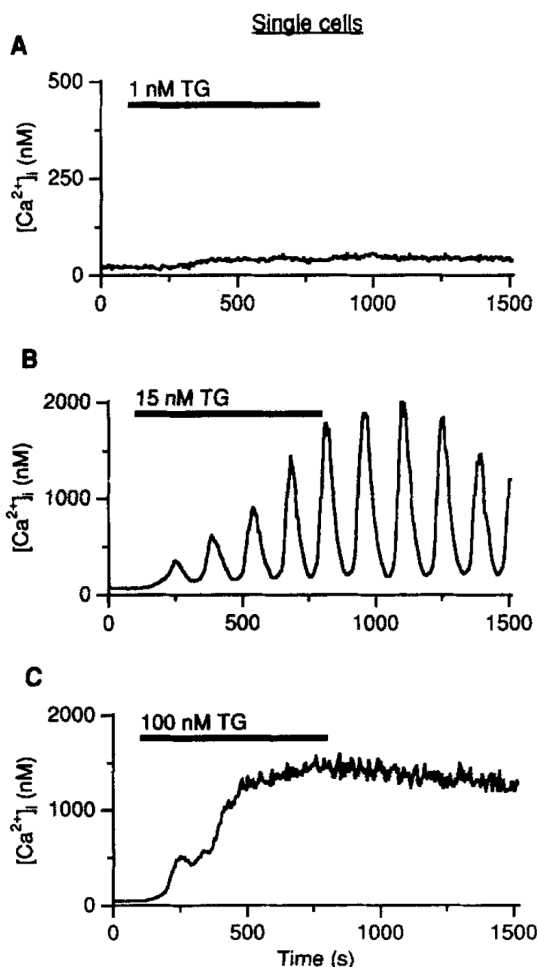


Abb. 2: Calcium-Oszillationen in einer T-Zelle

In humanen Jurkat-Zellen wird Calcium mit Fura-2 angefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet.

Die Calciumkonzentration zeigt eine starke Abhängigkeit von der Dosis an Thapsigargin (TG) über einen zeitlichen Verlauf von 1500 Sekunden.

(A) Unter Zugabe von 1 nM TG steigt die Calciumkonzentration, ausgehend von etwa 22 nM, langsam an und erreicht nach etwa 300 s ein Plateau bei circa 55 nM.

(B) Unter Zugabe von 15 nM TG sind synchrone Oszillationen erkennbar, zunächst bis 1100 s mit ansteigender Amplitude, ab der maximalen Calciumkonzentration von 2000 nM mit geringer werdender Amplitude.

(C) Unter Zugabe von 100 nM TG nimmt die Calciumkonzentration sprunghaft mit einem „Peak“ von 500 nM bei circa 250 s zu. Dann wird mit einer Konzentration von etwa 1500 nM im zeitlichen Verlauf ab 500 s die Plateauphase erreicht.

(entnommen aus: Dolmetsch und Lewis, 1994; Abb. 1 „einzelne Zelle“)

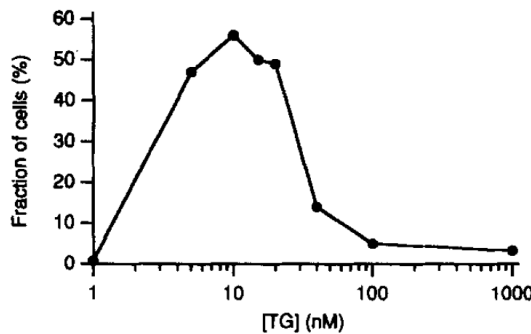


Abb. 3: Abhängigkeit der Calcium-Oszillationen von Thapsigargin

Anteil der Zell-Population, der in Abhängigkeit der TG-Dosis oszilliert.
TG-Exposition für 800 s bei einer extrazellulären 2 mM Ca^{2+} -Konzentration.

(entnommen aus: Dolmetsch und Lewis, 1994; Abb. 2C)

Eine zentrale Rolle bei der Generierung des Calciumsignals und den Oszillationen übernehmen die CRAC in der Plasmamembran (Putney, 1986; Dolmetsch und Lewis, 1994; Liou et al., 2005; Luik et al., 2008). Aufgrund der Leerung des ER-Calciumspeichers, *in vitro* durch Thapsigargin ausgelöst, kommt es zum SOCE durch die CRAC (Dolmetsch und Lewis, 1994). Die Inhibierung der SERCA-Pumpe in der ER-Membran mittels der Blocker Thapsigargin, Cyclopiazonsäure oder Tertiär-Butylhydrochinon führt zu einer Verstärkung des Calciumeinstroms durch den CRAC, ohne dass der Signalkette eine IP_3 -Produktion durch die Phospholipase C vorausgegangen ist (Takemura et al., 1989; Putney, 1990).

Die zytosolische Calciumdynamik wird sowohl durch das Ausströmen des Calciums aus dem ER als auch durch das Einstromen extrazellulären Calciums verursacht (Lewis und Cahalan, 1989; Dolmetsch und Lewis, 1994; Bautista et al., 2002).

Bezüglich der Calciumsignale in T-Killerzellen konnte gezeigt werden, dass die Oszillationen in etwa 20% der T-Zellen auftreten, wenn diese mit dem Mitogen Phytohämagglutinin oder monoklonalen Antikörpern stimuliert werden (Hess et al., 1993). Eine Aktivierung der T-Zellen mittels des SERCA-Blockers Thapsigargin, wodurch eine Leerung des Calciumspeichers erreicht wird und über den SOCE ein Einstrom von Calcium resultiert, löst hingegen bei T-Killerzellen keine Calcium-Oszillationen aus (Hess et al., 1993). Die Aktivierung mit Thapsigargin bewirkt hier zwar einen Calcium-Anstieg, jedoch keine starken Calcium-Fluktuationen, wie sie bei der Stimulation des T-Zell-Rezeptors mit Phytohämagglutinin beobachtbar sind (Hess et al., 1993). Im Vorfeld der Mitogen-induzierten Oszillationen ist ein deutlicher Anstieg in der Konzentration des zytosolischen Calciums feststellbar, der auf den Ausstrom des Calciums aus dem ER zurückzuführen ist (Hess et al., 1993). Die Oszillationen resultieren dann in der Folge durch den Calcium-Einstrom aus dem Extrazellulärraum (Hess et al., 1993). Dabei ist die Aufrechterhaltung des negativen Potentials der Plasmamembran entscheidend, um den Calciumeinstrom längerfristig zu ermöglichen (Hess et al., 1993).

3.2. Biphasisches Calciumsignal

Das einzelne Signal, das durch den „second messenger“ IP_3 und die Leerung des ER-Calciumspeichers mit anschließendem Calcium-Einstrom durch den CRAC gebildet wird, erscheint, wie in Abbildung 4 gezeigt, zweiphasig (Putney, 1990; Bautista et al., 2002).

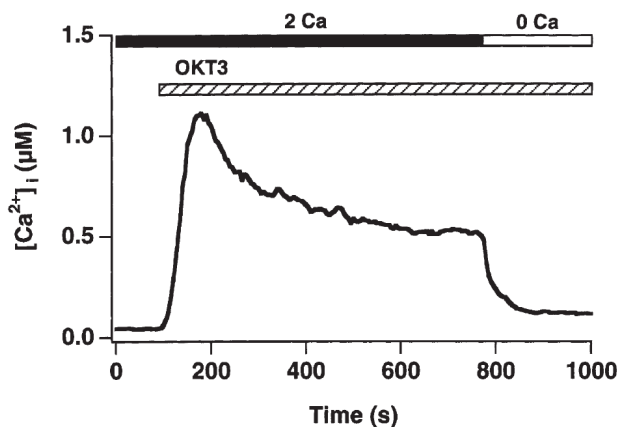


Abb. 4: Biphasisches Calciumsignal

Stimulation einer Jurkat-T-Zelle mit dem Antikörper OKT3. Die Zelle befindet sich in 2 mM-Calcium-Medium.

Es kommt zu einem „Calciumpeak“ im Zytosol mit einer Amplitude von 1,17 μM (Leerung des ER-Calciumspeichers und SOCE) mit anschließender Plateauphase (Calciumkonzentration wird durch die PMCA gesenkt).

(entnommen aus: Bautista et al., 2002; Abb. 1A)

Das biphasische Calciumsignal resultiert aus der Stimulation des T-Zell-Rezeptors mit einem monoklonalen Antikörper. Wie in Abbildung 4 dargestellt, besteht das Signal aus einem deutlichen Maximum mit einer Amplitude von 1,17 μM zytosolischem Calcium über eine Dauer von 200 s und einer sich anschließenden Plateauphase im Bereich von 0,5 μM über eine Dauer von 600 s (Bautista et al., 2002). Der „Calciumpeak“ kann sowohl mit der Calcium-Freisetzung aus dem ER in Verbindung gebracht werden, als auch mit dem Calciumeinstrom durch den CRAC in Zusammenhang stehen (Bautista et al., 2002). Die Plateauphase wird auf das verspätete Einsetzen der PMCA zurückgeführt, die beim Abklingen der Aktivierung für das Ausströmen des Calciums aus dem Zytosol in den Extrazellulärraum verantwortlich ist (Bautista et al., 2002).

4 Modellierung der Calciumdynamik in T-Zellen

Das Calciumsignal und die Calciumdynamik in T-Lymphozyten stehen in engem Zusammenhang mit der Entstehung von Autoimmunkrankheiten und der Transplantat-Abstoßung (Partiseti et al., 1994; Gauld et al., 2005; McCarl et al., 2010; Feske, 2011). Dies beruht darauf, dass Calcium für die Aktivierung von T-Lymphozyten, ihre Differenzierung und ihre immunologische Funktion eine bedeutende Rolle spielt.

Vor diesem Hintergrund wird in der vorliegenden Arbeit ein Modell vorgestellt, das als Grundlage dienen kann, um Pharmaka zu untersuchen, die ihre immunsuppressive Wirkung durch Unterdrückung des Anstiegs der Calciumkonzentration in T-Lymphozyten ausüben. Das Modell wird dabei im Kontext (siehe Kapitel II, 4.2) vorangegangener Calcium-Modelle gesehen, die im Folgenden beschrieben werden (Kapitel II, 4.1).

4.1 Calcium-Modelle

T-Zellen sind, im Gegensatz zu Neuronen, nicht elektrisch erregbar (Lewis and Cahalan, 1989). Sie sind folglich nicht zur Generierung von Aktionspotentialen in der Lage, zeigen jedoch in Folge ihrer Aktivierung zytosolische Calcium-Oszillationen (Hess et al., 1993; Dolmetsch und Lewis, 1994) oder biphasische Calciumsignale (Bautista et al., 2002). Es existieren in der Literatur nur wenige Modelle mit dem Schwerpunkt auf der Simulation der Calciumdynamik in T-Lymphozyten.

4.1.1 Modell der Calciumdynamik an der immunologischen Synapse

Das Modell von Martin et al. veranschaulicht die Calciumdynamik an der immunologischen Synapse einer T-Zelle und berücksichtigt zusätzlich die Kaliumdynamik (Martin et al., 2012). Dies ist dadurch begründet, dass nach der Aktivierung der T-Zelle und dem Calciumeinstrom durch den CRAC calciumabhängige Kaliumkanäle aktiviert werden, die durch einen Ausstrom des Kaliums aus der T-Zelle das negative Membranpotential gewährleisten und so den Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration aufrechterhalten (Hess et al., 1993; Cahalan und Chandy, 2009). Dieser Zusammenhang zwischen Calcium- und Kaliumionen ist Grundlage des mathematischen Modells von Martin et al. Es beschreibt die Dynamik von Calcium und Kalium bei der Ausbildung der immunologischen Synapse nach erfolgter T-Zell-Aktivierung (Lioudyno et al., 2008; Martin et al., 2012). Das Ziel der Modellierung ist dabei insbesondere die großemäßige

Abschätzung der Kalium-Anreicherung im synaptischen Spalt und die Untersuchung der Auswirkungen auf die Konzentration des zytosolischen Calciums (Abb. 1 in Martin et al., 2012). Da der Spalt der immunologischen Synapse sehr klein ist, sind Ergebnisse aus Experimenten zur Konzentrationsbestimmung des Kaliums im Bereich der Synapse kaum verfügbar, was die Simulation des Ein- und Ausstroms von Ionen mittels eines mathematischen Modells nahelegt (Cahalan und Chandy, 2009; Martin et al., 2012). Das Modell umfasst die Darstellung der Kaliumdiffusion im Spalt der immunologischen Synapse und die damit in Zusammenhang stehenden Ionenströme von Kalium und Calcium. Die immunologische Synapse zwischen der antigenpräsentierenden Zelle und der T-Zelle wird im Modell räumlich in zylindrischer Form repräsentiert und es werden zwei Typen von Kalium-Kanälen ($K_v1.3$ und $K_{Ca3.1}$) sowie der CRAC als Calciumkanal in das Modell übernommen (Lioudyno et al., 2008; Martin et al., 2012). Die T-Zell-Plasmamembran wird als Kondensator modelliert und die Kanäle sind als Widerstände mit der treibenden Kraft der Ionen als Spannungsquelle integriert (Hodgkin und Huxley, 1952; Martin et al., 2012). Die PMCA wird bezüglich des Membranpotentials im Modell von Martin et al., 2012 nicht berücksichtigt (Thomas, 2009; Martin et al., 2012). In die Gleichung für den Calciumstrom durch den CRAC gehen nicht direkt physiologische Werte aus der Literatur ein, sondern die Stromgleichung wird im Modell mit Parametern aufgestellt, die an experimentelle Daten angepasst werden („empirical fit“) (Martin et al., 2012). Mithilfe des Modells kann gezeigt werden, dass in aktivierten T-Zellen das Kalium im synaptischen Spalt von 5,0 mM auf 5,2–10,0 mM ansteigt und Kalium-Kanäle in den Membranen am synaptischen Spalt akkumulieren (Abb. 4A in Martin et al., 2012). Dadurch kommt es in der Folge zu einer Abnahme des Kaliumausstroms aus der Zelle und das zytosolische Calcium erfährt keine weitere Konzentrationszunahme (Abb. 4D in Martin et al., 2012). Die Untersuchung der Vorgänge am synaptischen Spalt im Rahmen der mathematischen Modellierung zeigt, dass extrazelluläres Kalium inhibitorisch auf das Calciumsignal wirkt und damit einen negativen Feedback-Mechanismus auslöst (Hess et al., 1993; Cahalan und Chandy, 2009; Martin et al., 2012).

4.1.2 Modell des „Store-Operated Calcium Entry“

Bei Kowalewski et al. erfolgt die Modellierung der Calciumdynamik zwar nicht explizit für die T-Zelle, jedoch wird der Beitrag des SOCE zur Generierung von Calcium-Oszillationen anhand mathematischer Simulationen betrachtet (Kowalewski et al., 2006). Hierzu wird ein Modell vorgestellt, das aus gewöhnlichen Differentialgleichungen aufgebaut ist und

welches sowohl die zytosolische Calciumkonzentration als auch die Calciumkonzentration im ER sowie die Konzentration von IP_3 im zeitlichen Verlauf nach erfolgter Aktivierung wiedergibt (Kowalewski et al., 2006). Das Modell nimmt dabei jedoch anstelle der real existierenden Verknüpfung der ER-Leerung mit dem SOCE über das Molekül STIM1 einen hypothetischen Calciumeinstrom-Faktor (CIF) an und entspricht in diesem Punkt nicht den physiologischen Verhältnissen (Liou et al. 2005; Kowalewski et al., 2006; Lewis, 2007). Darüber hinaus findet die Modellierung nicht auf experimenteller Basis statt und verwendet in der Erstellung der Gleichungen vielfach Konstanten, so zum Beispiel die „SOC production constant“ (Kowalewski et al., 2006), anstatt quantitativer Daten aus der Literatur (Meyer-Hermann, 2007; Schmeitz et al., 2013). Aus dem Resultat der Simulation des SOCE-Anteils am Calciumsignal (Kowalewski et al., 2006) kann jedoch die Erkenntnis gezogen werden, dass der SOCE für die Amplitude und die Frequenz von Calcium-Oszillationen von herausragender Bedeutung ist (Abb. 5 und 6 in Kowalewski et al., 2006). Bestimmte experimentelle Befunde (Dolmetsch und Lewis, 1994; Gregory und Barritt, 2003) finden sich durch die mathematischen Simulationen (Kowalewski et al., 2006) somit bestätigt. Des Weiteren werden zwei grundlegende Ansätze der Modellierung des IP_3R miteinander verglichen (Kowalewski et al., 2006): Das Mak-McBride-Foskett-Modell (Mak et al., 1998) wird dem De Young-Keizer-Modell (De Young und Keizer, 1992) gegenübergestellt. Die beiden Modellierungsansätze unterscheiden sich darin, dass das De Young-Keizer-Modell ein vereinfachtes kinetisches Modell generell für IP_3R darstellt (De Young und Keizer, 1992), das Mak-McBride-Foskett-Modell hingegen ist spezifisch für die IP_3R -Typen 1 und 3 erstellt und basiert auf experimentellen Messungen (Mak et al., 1998). Die *in silico*-Versuche von Kowalewski et al. zeigen im Vergleich der IP_3R -Modellierungsansätze hinsichtlich der Auswirkungen auf die Calciumdynamik, dass die resultierenden Oszillationen des zytosolischen Calciums bezüglich ihrer Frequenz und Amplitude in Abhängigkeit des jeweils verwendeten IP_3R -Modells variieren (Abb. 3 in Kowalewski et al., 2006). Mit dem Mak-McBride-Foskett-Modell werden, im Vergleich zum De Young-Keizer-Modell, größere Amplituden bei geringerer Frequenz erzielt (Abb. 3 und 4 in Kowalewski et al., 2006). Darüber hinaus bestehen in Bezug auf diejenigen IP_3 -Konzentrationen, im Bereich derer die Calcium-Oszillationen überhaupt auftreten können, Unterschiede zwischen dem De Young-Keizer-Modell und dem Mak-McBride-Foskett-Modell (Abb. 4 in Kowalewski et al., 2006). Das De Young-Keizer-Modell lässt Oszillationen lediglich innerhalb des engen IP_3 -Konzentrationsbereichs zwischen 30 nM und 43 nM zu, dagegen sind beim Mak-McBride-Foskett-Modell Oszillationen für alle IP_3 -Konzentrationen oberhalb eines Schwellenwertes von 12 nM gegeben (Abb. 4B in

Kowalewski et al., 2006). Die von Kowalewski et al. durchgeführten Simulationen erörtern einerseits die Relevanz der jeweiligen Auswahl von Modellierungsansätzen und andererseits wird der Stellenwert des SOCE für zytosolische Calcium-Oszillationen betont (Kowalewski et al., 2006).

4.2 Vorteile des neu entwickelten Calciumdynamik-Modells

Ziel der mathematischen Modellierung der Calciumdynamik in T-Lymphozyten ist die quantitative Analyse des biphasischen Calciumsignals nach erfolgter T-Zell-Aktivierung (Schmeitz et al., 2013). Mit den Simulationen werden experimentelle Resultate *in silico* dargestellt und verschiedene Einflüsse auf die Calciumkonzentration können untersucht werden. Darauf aufbauend erfolgt die Erstellung von Prognosen zur Entwicklung der Calciumdynamik unter bestimmten Bedingungen.

Die Motivation zur Erstellung eines Calciumdynamik-Modells der T-Zelle wird durch den Aspekt der Umsetzung physiologischer Einzelkanal-Charakteristika in das Modell begründet. Als Grundlage dienen hierbei voneinander unabhängige, experimentell durchgeführte, spezifische quantitative Messungen zur Aktivierung und Inaktivierung der Transmembranproteine sowie zu den jeweiligen Abhängigkeiten und Leitfähigkeiten der Kanäle und Pumpen (Meyer-Hermann, 2007). Aufgrund der Implementierung von Einzelkanal-Eigenschaften in das Modell wird die Anzahl der unbekannten Parameter im Modell auf ein Minimum reduziert und die Aussagekraft der mathematischen Simulationen wird intensiviert und erweitert (Meyer-Hermann, 2007; Schmeitz et al., 2013).

4.2.1 Experimentelle Grundlagen

Einige der Calciumdynamik-Experimente, die mit den Simulationen repräsentiert werden können, sind Messungen, bei denen zur Aktivierung der T-Zelle die SERCA-Blocker Thapsigargin oder Cyclopiazonsäure verwendet werden (Quintana et al., 2006; Luik et al., 2008). Dies könnte dazu führen, dass in diesen Experimenten vorrangig die Entstehung des biphasischen Calciumsignals beobachtet wird und die Ausbildung von Calcium-Oszillationen eher nicht auftritt (Hess et al., 1993). In einem anderen Experiment, dessen Resultate mit dem Calciumdynamik-Modell dargestellt werden können, wird die T-Zell-Stimulation mit einem monoklonalen Antikörper durchgeführt (Bautista et al., 2002). Auch in diesem Falle wird ein biphasisches Calciumsignal beschrieben (Abb. 1 in Bautista et al.,

2002), auf das im Rahmen der vorliegenden Arbeit verstärkt eingegangen werden wird (siehe Kapitel IV). Einerseits sind es die Beiträge des CICR, die das biphasische Calciumsignal in T-Zellen generieren (Bautista et al., 2002). Mit dem CICR ist hier der Anteil des freigesetzten Calciums aus dem ER in das Zytosol gemeint, der mit einer Leerung des ER-Calciumspeichers und folglich mit einer Erhöhung der Konzentration des zytosolischen Calciums einhergeht (Dolmetsch und Lewis, 1994; Fomina et al., 2000; Dadsetan et al., 2008). Andererseits spielt der SOCE und damit der Einstrom extrazellulären Calciums durch den CRAC eine wesentliche Rolle für den Anstieg der Calciumkonzentration im Zytosol (Putney, 1986; Bautista et al., 2002; Liou et al., 2005; Feske, 2007). Die Beiträge des CICR und des SOCE zur Konstituierung des biphasischen Calciumsignals können anhand der Simulationen mit dem Calciumdynamik-Modell untersucht werden. Um diesen Anforderungen gerecht werden zu können, verfügt das Calciumdynamik-Modell der T-Zelle über spezielle Eigenschaften.

4.2.2 Realisierung von Einzelkanal-Charakteristika

In der oben beschriebenen Untersuchung der Calciumdynamik und des SOCE (Kowalewski et al., 2006) werden für die Simulationen jeweils Gesamt-Calciumströme anstelle des spezifischen Calciumein- bzw. Calciumausstroms durch einzelne Kanäle berücksichtigt. In die mathematische Darstellung der Differentialgleichung für die Calciumdynamik im Zytosol gehen somit jeweils die Gesamtströme ein. Das heißt in diesem Falle, dass unter den Bezeichnungen „ J_{ER} channel“ (Gleichung (1) in Kowalewski et al., 2006) beziehungsweise „ J_{PM} channel“ die jeweiligen Calcium-Gesamtströme durch die ER-Membran und durch die Plasmamembran zusammengefasst werden. Das hier vorgestellte Calciumdynamik-Modell der T-Zelle basiert hingegen auf der mathematischen Umsetzung von Einzelkanal-Charakteristika aller relevanten Calciumkanäle und berücksichtigt bei der Kalkulation des Stromflusses die expliziten Ionenströme durch den jeweiligen Kanal (nach Meyer-Hermann, 2007). Separate Berücksichtigung finden im Modell von Kowalewski et al. die beiden Calciumpumpen SERCA und PMCA (Gleichung (1) und (2) in Kowalewski et al., 2006), die sich in der ER-Membran und der Plasmamembran befinden, und in diesem Modell zur Veränderung der zytosolischen Calciumkonzentration beitragen. Der CRAC wird mit seinen Kanaleigenschaften nicht modelliert, sondern erfährt nur indirekte Beachtung in der mathematischen Repräsentation der „Store-Operated Channels“ (SOC) (Gleichung (13) in Kowalewski et al., 2006). Das neue Calciumdynamik-Modell der T-Zelle dagegen integriert sowohl die PMCA als

auch die SERCA, darüber hinaus auch den CRAC und den IP_3R . Die Pumpen und Kanäle werden im Calciumdynamik-Modell der T-Zelle insbesondere hinsichtlich ihrer jeweiligen Aktivierungs- und Inaktivierungswahrscheinlichkeiten, ihrer Leitfähigkeiten und ihrer Abhängigkeiten in Bezug auf Spannungsänderungen oder Calciumkonzentrationen charakterisiert. Bei Martin et al. findet sich zwar eine T-Zell-spezifische Repräsentation des CRAC, jedoch basiert diese bezüglich des Calciumeinstromes auf der Summation empirisch angepasster Parameter (Gleichung (2) in Martin et al., 2012) und nicht – wie es im neuen Calciumdynamik-Modell der T-Zelle umgesetzt wird – auf der Verwendung von Messdaten zur quantitativen Bestimmung der Leitfähigkeit des CRAC. Zudem wird, im Gegensatz zu dem hier vorgestellten Modell der Calciumdynamik in der T-Zelle, die PMCA bei Martin et al. nicht als einzelner Kanal modelliert, sondern der Calciumausstrom durch die PMCA mittels einer Michaelis-Menten-Kinetik angenähert (Gleichung (3) in Martin et al., 2012).

4.2.3 Physiologische Repräsentation des SOCE

Ein weiteres wichtiges Kriterium für die Erarbeitung des neuen T-Zell-Modells ist eine experimentell etablierte mathematische Realisation des SOCE. Bei der Darstellung des SOCE in Kowalewski et al. wird – im Gegensatz zum neuen Calciumdynamik-Modell – darauf verzichtet, das STIM1, welches für die Informationsweitergabe zwischen dem ER-Calcium-Füllungszustand und dem Einstrom extrazellulären Calciums verantwortlich ist, einzugliedern. Stattdessen wird von einem hypothetischen „Calcium-Influx Factor“ (CIF) ausgegangen (Gleichungen (13)–(15) in Kowalewski et al., 2006). Vermutlich ist dies mit den in der damaligen Zeit noch bestehenden Ungereimtheiten bezüglich der Identität des Überträgermoleküls zwischen dem ER und der Plasmamembran zu erklären (Lewis, 2007) sowie mit der Tatsache, dass ein allgemeines Modell aufgestellt wird – ohne die Festlegung auf einen spezifischen Zelltyp (Kowalewski et al., 2006). Einer etwas unphysiologischen Repräsentation entspricht zudem die mathematische Umsetzung des Calcium-Füllungszustandes des ER: Hier arbeitet das Modell von Kowalewski et al. mit einem Schalter (Gleichung (16) in Kowalewski et al., 2006). Dies lässt jedoch eine dynamische Simulation mit graduellen Übergängen nicht zu. Das neue Calciumdynamik-Modell der T-Zelle simuliert den SOCE daher auf der Basis quantitativer experimentell durchgeführter Messungen, die einen direkten Zusammenhang zwischen dem ER-Calcium-Füllungszustand und der CRAC-Rekrutierung beweisen (Luik et al., 2008). Der Calciumgehalt des ER wird dabei unter Beachtung der gerichteten Calciumströme durch die SERCA und den IP_3R dynamisch simuliert.

4.2.4 Berücksichtigung der Dichten der Transmembranproteine

Mit der Aktivierung des T-Lymphozyten aus dem Ruhezustand heraus verändert sich die Dichte einiger Transmembranproteine, darunter die der Kaliumkanäle (Decoursey et al., 1987; Grissmer et al., 1993; Martin et al., 2012) sowie die des CRAC (Luik et al., 2006; Li et al., 2011; Hou et al., 2012). Von einer Erhöhung der Anzahl der Kanäle wird beispielsweise bezüglich der Kaliumkanäle $K_{Ca3.1}$ und $K_v1.3$ ausgegangen (Decoursey et al., 1987; Grissmer et al., 1993). In der Modellierung von Martin et al. wird eine feste Anzahl an Kaliumkanälen jeweils für $K_v1.3$ sowie $K_{Ca3.1}$ in den Gleichungen für die Kaliumströme in einem aktivierten T-Lymphozyten angenommen (Gleichungen (5) und (10) in Martin et al., 2012). Die Dichte der CRAC in der Plasmamembran wird dabei nicht in das Modell integriert (Gleichung (2) in Martin et al., 2012). Da der CRAC jedoch erst nach der Aktivierung der T-Zelle aus den ORAI-Proteinen rekrutiert wird (Luik et al., 2006; Hou et al., 2012) und dann mit bis zu zehntausend Exemplaren vertreten sein kann (Parekh, 2010), erfolgt die Darstellung der CRAC-Dichte im neuen Calciumdynamik-Modell in Form einer separaten Differentialgleichung, um die Dynamik dieser Dichte zu berücksichtigen. Bis dato ist das hier vorgestellte Modell das erste Calciumdynamik-Modell eines T-Lymphozyten, in welchem die dynamische Proteindichte für den CRAC mathematisch umgesetzt wird.

Das neue Calciumdynamik-Modell berücksichtigt zudem explizit die quantitative Darstellung der Calciumkanäle SERCA, IP_3R und PMCA. Alle Transmembranproteine, die in die Differentialgleichungen zur Repräsentation des zeitlichen Verlaufs der zytosolischen Calciumkonzentration und des Calciumgehalts im ER eingehen, werden mit ihren Ionenströmen integriert und jeweils mit ihrer spezifischen Dichte multipliziert (nach Meyer-Hermann, 2007). Zur Bestimmung der Anzahl der Kanäle oder Pumpen in der Plasmamembran und dem ER werden nach Möglichkeit Literaturdaten herangezogen beziehungsweise es wird für die verbleibenden Parameter eine Anpassung mittels eines „fit“-Algorithmus vorgenommen.

III METHODEN

1 Technische Grundlagen des Calciumdynamik-Modells der T-Zelle

Die Modellierung der Calciumdynamik der T-Zelle hat sowohl die Reproduktion experimenteller Befunde zum Ziel, unter anderem die Repräsentation des biphasischen Calciumsignals (Bautista et al., 2002), als auch die Generierung darüber hinausgehender Prognosen. Mit einem auf diese Weise experimentell validierten mathematischen Grundmodell wird eine Basis für zukünftige pharmakologische *in silico*-Versuche geschaffen. Die exakte physiologische Umsetzung von experimentell gewonnenen Daten in die Gleichungen, die das mathematische T-Zell-Grundmodell bilden, ist daher unumgänglich. Sämtliche Parameter, die zur Charakterisierung von Kanälen und Pumpen nötig sind, werden daher im (elektro-)physiologischen Sinne in das Modell übertragen.

1.1 Modellierung mit Differentialgleichungen

Bezüglich der Aufstellung der Differentialgleichungen wird dem Modell der Calciumdynamik in T-Zellen das Modell der Elektrophysiologie der Betazelle (Meyer-Hermann, 2007) zugrunde gelegt und entsprechend der Besonderheiten der T-Lymphozyten variiert und umgearbeitet.

1.1.1 Elektrophysiologie als Grundlage

Mit dem elektrophysiologischen Modell der Betazelle, auf dem das T-Zell-Modell technisch basiert, werden Vorhersagen zur Bedeutung einzelner Kanäle und zur Abfolge der Ereignisse bei der Generierung der Glukose-stimulierten Calcium-Oszillationen sowie zusätzlich zu der Dynamik der Natrium- und Kaliumionen getroffen, welche experimentell verifiziert werden können (Meyer-Hermann, 2007). Die Calciumdynamik, die in Betazellen beobachtbar ist und repetitive Einzelsignale sowie Oszillationen umfasst, kann für verschiedene experimentelle Situationen *in silico* simuliert werden (Meyer-Hermann, 2007). Zur Generierung der Simulationen baut das Modell dabei auf dem physiologischen Mechanismus der Betazell-Aktivierung auf: Die Glukose wird in den Betazellen metabolisiert und als Produkt resultiert Adenosintriphosphat (ATP), welches die Kaliumkanäle inhibiert (Rorsman, 2005). In der Folge kommt es zu einem verminderten Ausstrom von Kalium, wodurch die Zellmembran depolarisiert wird und spannungs-

abhängige Calciumkanäle eine Aktivierung erfahren. Daraufhin strömt Calcium in die Betazelle und stimuliert die Exozytose der insulingefüllten sekretorischen Vesikel (Rorsman, 2005).

Das elektrophysiologische Modell der Betazelle ist folgendermaßen aufgestellt (Meyer-Hermann, 2007):

Es beinhaltet sämtliche relevanten Ionenkanäle und Pumpen und gibt diese in physiologischer Form wieder, unter Einbeziehung ihrer jeweiligen Aktivierungs- und Inaktivierungs-Parameter. Das Modell repräsentiert eine Betazelle, die als singulär betrachtet und nicht in den Kontext der Langerhansschen-Inseln gestellt wird. Die mathematische Umsetzung der biologischen Verhältnisse in das Modell erfolgt in der Form von Differentialgleichungen, dabei sind Calcium, Kalium und Natrium in jeweils einer Gleichung dargestellt sowie das Membranpotential in einer weiteren Gleichung. Die genannten Differentialgleichungen beinhalten algebraische Gleichungen für die Aktivierungs- und Inaktivierungs-Wahrscheinlichkeiten der Transmembranproteine und der jeweiligen Ionenströme sowie für die Berechnungen im Zusammenhang mit der Calcium-Bindungsfähigkeit des Calmodulins und bezüglich der räumlichen Gegebenheiten der Betazelle. In die Gleichungen zur Errechnung der Ionenströme durch spannungsabhängige Kanäle ist das Umkehrpotential integriert, welches die Konzentrationsgradienten der Ionen auf beiden Seiten der Membran und die daraus resultierende Auswirkung auf den Stromfluss berücksichtigt. Die erforderlichen Parameter für die Berechnungen zur Modellierung der Transmembranproteine werden weitestmöglich aus Experimenten übernommen. Hierzu muss als Annahme vorausgesetzt werden, dass die Kanal-Eigenschaften autonom sind und, unabhängig vom beobachteten Zelltyp, in ihrer grundlegenden charakteristischen Arbeitsweise und bezüglich der jeweiligen Parameter immer gleich sind. Die Dichte der Proteine in der Plasmamembran wird variabel modelliert und nach Verfügbarkeit jeweils aus der Literatur entnommen oder als freier Parameter behandelt. Um den biologischen Gegebenheiten zu entsprechen, wird die Betazelle aus dem Gleichgewichtszustand („steady state“) heraus mit Glukose stimuliert. Die ATP-Dynamik ist nicht in das Modell integriert, ebenso wird das ER nicht als dynamische Calcium-Ressource berücksichtigt. Die Auswirkungen der Stimulation auf die Calciumkonzentration, das Membranpotential, die Stärke der Ionenströme sowie auf die jeweilige Aktivierungs-Wahrscheinlichkeit der einzelnen Transmembranproteine sind im Modell über einen Zeitraum von Minuten *in silico* beobachtbar. So sind *in vitro*-Experimente reproduzierbar und hinsichtlich der Beteiligung der Ionenströme von Calcium, Kalium und Natrium sowie in Bezug auf die Abfolge der Kanalaktivierung bei der Generierung von

Calcium-Oszillationen analysierbar. Zusätzlich können darüber hinausgehende Prognosen und Vorschläge für weitere Experimente entwickelt werden.

Das im Folgenden beschriebene T-Zell-Modell orientiert sich bezüglich der mathematisch-strukturellen Charakterisierung der Kanalproteine und der gesonderten Berücksichtigung der Proteindichten am Betazell-Modell.

1.1.2 Mathematische Umsetzung des T-Zell-Modells

Für das Calciumdynamik-Modell der T-Zelle wird ein vergleichbarer methodischer Aufbau wie für das oben beschriebene Betazell-Modell gewählt. Zur Simulation der Calciumdynamik in T-Lymphozyten müssen die Charakteristika der Transmembranproteine sowie biophysikalische und physiologische Gegebenheiten mathematisch im Modell verwirklicht werden, um damit aussagekräftige Resultate zu erhalten und zukünftig pharmakologische Simulationen *in silico* durchführen zu können. Ein erster Ansatz ist es, ein Grundmodell der Calciumdynamik der T-Zelle aufzustellen, welches – analog zum Modell der Betazelle – sämtliche Transmembranproteine enthält, die für die Calciumdynamik von Bedeutung sind. Da das ER in T-Zellen eine wesentliche Rolle für den SOCE spielt (Penner und Neher, 1988), ist es darüber hinaus erforderlich, die Transmembranproteine in der ER-Membran sowie das Potential der ER-Membran in das Modell zu integrieren. Dabei ist auch die Beachtung des Umkehrpotentials zur Berechnung der Stromstärke durch spannungsabhängige Kanäle wesentlich (Hille, 1992).

Mit einem Modell, das zunächst vorrangig die Calciumdynamik berücksichtigt und bei dem auf eine differenziertere Betrachtung der Membranpotentiale verzichtet wird, gelingt es, signifikante und verifizierte Ergebnisse zu erzielen (Schmeitz et al., 2013). Das hier vorgestellte Calciumdynamik-Modell der T-Zelle steht dabei im Kontext bisheriger Calcium-Modelle (Kapitel II, 4) (Marhl et al., 1997; Schuster et al., 2002; Kowalewski et al., 2006; Martin et al., 2012). Die Stärke des hier vorgestellten Calciumdynamik-Modells liegt jedoch in der speziellen Berücksichtigung der Proteindichten (nach Meyer-Hermann, 2007) und einer weitestmöglich physiologischen Umsetzung der biologischen Parameter im Rahmen der mathematischen Modellierung. Damit unterscheidet sich das Modell von bisherigen Simulationen deutlich und ist aufgrund der realistischen Umsetzung zur Durchführung zukünftiger pharmakologischer *in silico*-Szenarien geeignet.

In der vorliegenden Arbeit folgt die methodische Beschreibung des Modells (Kapitel III, 1.2–2.8) der Veröffentlichung zur Modellierung der Calciumdynamik der T-Zelle (Schmeitz

et al., 2013). Es wird der Modellansatz vorgestellt und es werden die Annahmen erläutert, welche aus technischen Gründen für das Modell getroffen werden. Dabei werden die Eigenschaften der Calcium-leitenden Transmembranproteine in der Plasmamembran und im ER vorgestellt.

1.2 Modellansatz und Annahmen

Der Modellansatz geht von einem einzelnen T-Lymphozyten aus, der in Bezug auf drei Kompartimente berücksichtigt wird: Extrazellulärraum, Zytosol und ER. Das ER wird stellvertretend für die calciumspeichernden Organellen der T-Zellen (ER und Mitochondrien) dargestellt. Die Calciumdynamik des Zytosols und des ER wird in Form von gewöhnlichen Differentialgleichungen wiedergegeben. Sowohl die Plasmamembran als auch die ER-Membran sind in das Modell integriert. Die Kanäle und Pumpen in den Membranen verbinden die Kompartimente durch den Ein- oder Ausstrom von Calcium. Im Modell wird der ruhende sowie der aktivierte Zustand der T-Zelle durch die Eigenschaften der Transmembranproteine und durch ihre Anzahl in der Plasmamembran beziehungsweise in der ER-Membran charakterisiert. Die Einzelkanal-Charakteristika der Transmembranproteine, die in das Modell eingehen, basieren auf experimentellen Messungen. Diese sind unabhängig von den Calciumdynamik-Experimenten, mit denen das Modell validiert wird (Bautista et al., 2002; Quintana et al., 2006; Luik et al., 2008).

Die Calciumströme durch die Kanäle werden gemäß dem Ohmschen Gesetz über den elektrochemischen Gradienten ermittelt. In die Berechnung wird zudem die Spannungsabhängigkeit beziehungsweise die Calciumabhängigkeit der Aktivierung sowie der Inaktivierung des Kanals einbezogen. Der Ionenstrom durch die Pumpen wird in Abhängigkeit der aktivierenden Liganden Calcium und/oder IP_3 modelliert. Die ATP-Konzentration wird für den hier vorgestellten grundlegenden Modellansatz zur Kalkulation der Ionenströme durch die Pumpen nicht herangezogen. Für das Modell wird die Annahme getroffen, dass ATP in ausreichender Menge vorhanden ist, so dass von einer optimalen Pumpenfunktion ausgegangen werden kann.

Das untenstehende, stark vereinfachte Schema (Abb. 5) gibt einen Überblick über die T-Zelle mit den Transmembranproteinen, die im Modell berücksichtigt werden:

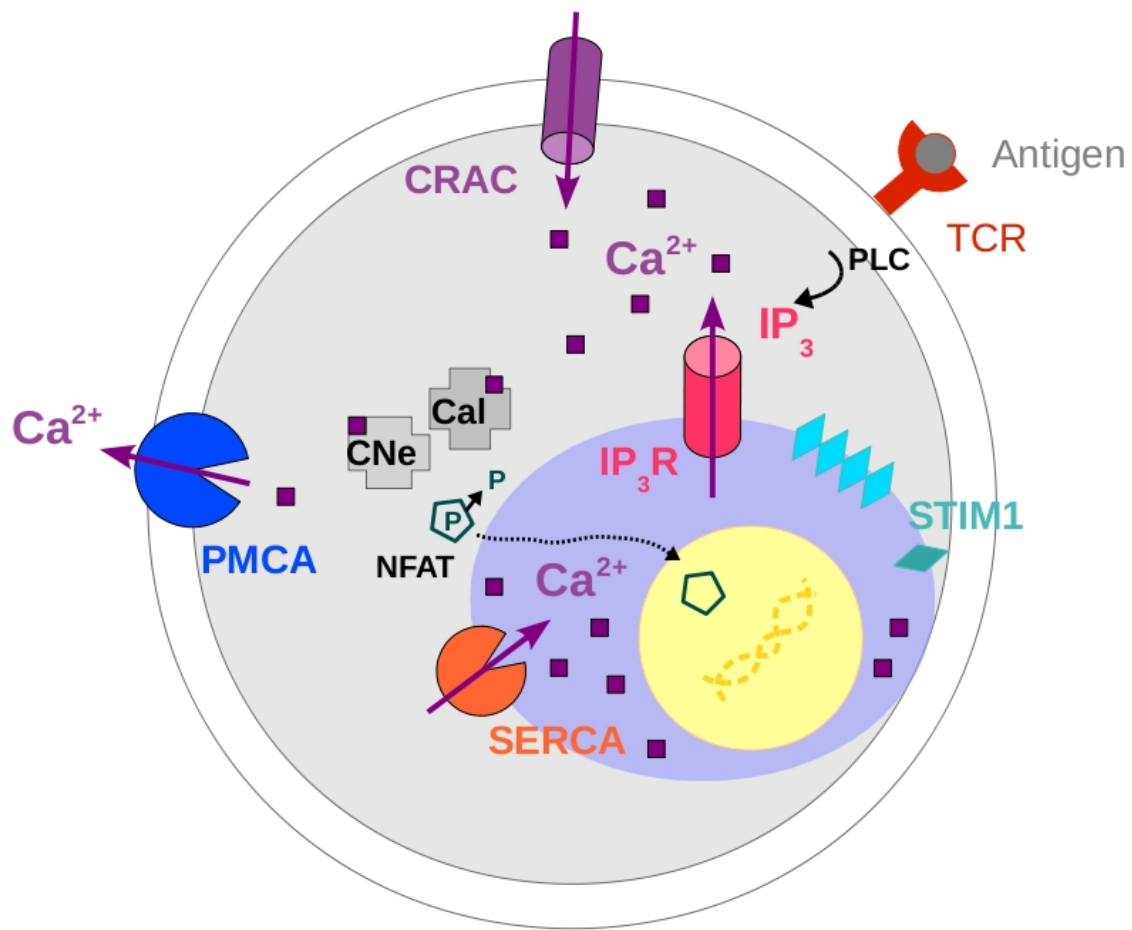


Abb. 5: Schema der T-Zelle als Grundlage des Modells

Die Signaltransduktion nach Antigen-Stimulation des T-Zell-Rezeptors (TCR) erfolgt durch die Freisetzung von IP_3 durch die Phospholipase C (PLC). Durch den Inositoltrisphosphat-Rezeptor (IP_3R) strömt Calcium aus dem ER. Die Calciumsensor-Moleküle STIM1 (türkise Rauten) bilden daraufhin Oligomere und rekrutieren den „Calcium-Release Activated Channel“ (CRAC) in der Plasmamembran (graue Doppellinie). Calcium strömt durch den CRAC in das Zytosol (hellgrau) und bindet an Calmodulin (Cal).

Calmodulin bildet mit Calcineurin (Cne) einen Komplex und dephosphoryliert den Transkriptionsfaktor NFAT (petrolfarbenes Fünfeck, mit symbolischer Phosphatabspaltung). Bei Abklingen der T-Zell-Aktivierung strömt Calcium durch die Plasmamembran-Calcium-ATPase (PMCA) zurück in den Extrazellulärraum und das ER wird durch die Sarkoendoplasmatische Retikulum-Calcium-ATPase (SERCA) wieder mit Calcium aufgefüllt.

Im Modellansatz werden nicht alle Kanäle und Pumpen, die für die T-Zelle beschrieben worden sind, integriert, da im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst ein Grundmodell erarbeitet wird. Dieses wird für Simulationen verwendet, mit denen experimentelle Resultate reproduziert und analysiert werden können. Darauf aufbauend wäre das Modell in einem zweiten Schritt unter Hinzunahme weiterer Kanäle komplexer zu gestalten.

Hier werden zunächst jedoch ausschließlich die Transmembranproteine in der

Plasmamembran und der ER-Membran, die für das zytosolische Calciumsignal entscheidend sind, berücksichtigt (Abb. 5). Dies sind der CRAC und die PMCA in der Plasmamembran sowie der IP₃R und die SERCA in der ER-Membran. Zum Ablauf der Signaltransduktion mit Generierung des Calciumsignals wird auf die Beschreibung in der Einleitung verwiesen (Kapitel II, 2.2). Der Ryanodin-Rezeptor (RyR) in der ER-Membran (Dammermann und Guse, 2005) sowie die Calciumkanäle vom L-Typ und die TRPM-Kanäle (Grafton und Thwaite, 2001; Stokes et al., 2004; Feske et al., 2012) werden nicht modelliert. Auch auf die Darstellung der Kaliumkanäle K_{Ca}3.1 und K_v1.3 (Kelly et al., 1991; Grissmer et al., 1993; Feske et al., 2012) wird im Calciumdynamik-Modell verzichtet. Bezüglich der „second messenger“, die das Modell beinhaltet, erfolgt eine Beschränkung auf IP₃. Um eine Überparametrisierung der Gesamt-Calciumströme der T-Zelle zu vermeiden, werden die Transmitter cADPR und NAADP (Guse et al., 1999; Guse, 2009) nicht in das Modell einbezogen. Im Zusammenhang mit einer Berücksichtigung des RyR im Rahmen einer Modell-Weiterentwicklung sollten cADPR und NAADP jedoch modelliert werden, da sie eine Rolle für die Leerung der Calciumspeicher spielen und sich verstärkend beziehungsweise regulierend auf das Calciumsignal auswirken (Da Silva und Guse, 2000; Berg et al., 2000).

Die freie zytosolische Calciumkonzentration (C) ist von Veränderungen des Calciumstroms zwischen dem Extrazellulärraum und dem Zytosol sowie entsprechend auch vom Calciumstrom zwischen dem Zytosol und dem ER abhängig (Abb. 5). Es sind zwei Transmembranproteine in der Plasmamembran für den Austausch von Calcium zwischen dem Extrazellulärraum und dem Zytosol entscheidend: Die PMCA transportiert Calcium aktiv aus dem Zytosol in den Extrazellulärraum (Bautista et al., 2002; Zylinska und Soszynski, 2000) und der CRAC erlaubt einen passiven elektrochemischen Calciumeinstrom (SOCE) in das Zytosol (Penner und Neher, 1988; Hoth und Penner, 1993; Zweifach und Lewis, 1993; Prakriya und Lewis, 2002; Kozak et al., 2002; Parekh, 2010). Die Dichte der aktiven CRAC (ρ_{CRAC}) in der Plasmamembran nimmt zu, wenn die Calciumkonzentration im ER (C_{ER}) sinkt (Luik et al., 2008). Das Calcium verlässt das ER durch den IP₃R als Reaktion auf eine Aktivierung durch IP₃ und Calcium (CICR) (Meyer et al., 1988; Mak et al., 1998; Parekh und Putney, 2005; Foscett et al., 2007). Die SERCA in der ER-Membran transportiert Calciumionen aktiv aus dem Zytosol in das ER und erhält dadurch den chemischen Calciumgradienten zwischen dem Zytosol und dem ER aufrecht (Dolmetsch und Lewis, 1994; Wuytack et al., 1994).

2 Calciumdynamik-Modell der T-Zelle

2.1 Calciumdynamik im Zytosol

Die Calciumkonzentration im Zytosol beträgt im ruhenden Zustand einer Jurkat-T-Zelle $0,1 \mu\text{M}$ (Bautista et al., 2002; Feske, 2007). Im ER kann der Calciumgehalt zwischen $0,1 \text{ mM}$ und $0,8 \text{ mM}$ liegen, in Abhängigkeit des Aktivierungszustandes der T-Zelle (Feske, 2007). Bei einer Jurkat-T-Zelle im Ruhezustand ist im ER eine Calciumkonzentration von $0,4 \text{ mM}$ messbar (Luik et al., 2008). Entsprechend wird im Modell für den Ruhezustand (ohne Stimulation des T-Zell-Rezeptors) eine zytosolische Calciumkonzentration C_0 von $0,1 \mu\text{M}$ und eine ER-Calciumkonzentration $C_{\text{ER},0}$ von $0,4 \text{ mM}$ eingesetzt.

Die Calciumdynamik im Zytosol wird durch jeweils zwei Transmembranproteine entsprechend für den Ein- und Ausstrom von Calcium bestimmt. Die freie zytosolische Calciumkonzentration C kann daher beschrieben werden mit

$$\frac{dC}{dt} = \frac{-1}{z_{\text{Ca}}F(1 + B_C)} (\xi \rho_{\text{PMCA}} I_{\text{PMCA}} + \xi \rho_{\text{CRAC}} I_{\text{CRAC}} + \xi_{\text{ERC}} \rho_{\text{SERCA}} I_{\text{SERCA}} + \xi_{\text{ERC}} \rho_{\text{IP3R}} I_{\text{IP3R}}), \quad (1)$$

wobei $z_{\text{Ca}} = 2$ für die Ladung des Calciumkations steht und F für die Faraday-Konstante. Die Faktoren ξ sowie ξ_{ERC} repräsentieren die geometrischen Oberflächen-Volumen-Verhältnisse der Plasmamembran zum Zytosol sowie der ER-Membran zum Zytosol (Gleichung (16) und (17)). Die Dichte der Transmembranproteine in den entsprechenden Membranen ist mit ρ_x wiedergegeben und I_x steht für den elektrischen Strom, der, vermittelt durch Calcium, durch das jeweilige Protein fließt. Es ist durch Konvention festgelegt, dass Kationen, die aus dem Extrazellulärraum oder aus dem ER in das Zytosol einströmen, als negativer elektrischer Strom gewertet werden (Hille, 1992). Kationen, die aus dem Zytosol in den Extrazellulärraum oder das ER einströmen, stellen entsprechend einen positiven elektrischen Strom dar (Hille, 1992).

Die Bindekapazität der zytosolischen calciumbindenden Proteine, darunter Calmodulin, wird approximiert mit

$$B_C = \frac{b_0 K_b}{(C + K_b)^2}. \quad (2)$$

Es wird vorausgesetzt, dass die Calcium-Bindung und -Freisetzung durch Calmodulin

nicht auf der Zeitskala der Ionendynamik stattfindet, sondern deutlich schneller abläuft („rapid buffer approximation“). In der Gleichung steht b_0 für die absolute Konzentration der Calciumbindungsstellen und K_b ist die Dissoziationskonstante der Calciumbindung. Der Anteil des freien Calciums berechnet sich dann durch

$$f_C = \left[1 + \frac{b_0}{C + K_b} \right]^{-1} . \quad (3)$$

Das wesentliche calciumbindende Protein im Zytosol ist das Calmodulin mit vier Calciumbindungsstellen. In der Literatur existieren unterschiedliche Angaben zur Konzentration des Calmodulins im Zytosol in Abhängigkeit vom betrachteten Zelltyp und dem Organ, aus dem die Zelle stammt (Kakiuchi et al., 1982; Tansey et al., 1994; Persechini und Cronk, 1999). Als realistischer durchschnittlicher Wert erscheint eine Calmodulinkonzentration von 25 μM , korrespondierend mit einer Calciumbindungsstellenkonzentration $b_0 = 100 \mu\text{M}$. Die Dissoziationskonstante K_b wird in Abhängigkeit des Anteils der freien zytosolischen Calciumkonzentration in nicht-erregbaren Zellen ($f_C \approx 0,1\%$) (Mogami et al., 1999) auf einen Wert von $K_b = 0,1 \mu\text{M}$ festgelegt.

2.2 Calciumdynamik im ER

Die Dynamik der Calciumkonzentration im ER (C_{ER}) wird, analog zur Calciumdynamik im Zytosol, beschrieben mit

$$\frac{dC_{\text{ER}}}{dt} = \frac{\xi_{\text{ER}} (\rho_{\text{SERCA}} I_{\text{SERCA}} + \rho_{\text{IP3R}} I_{\text{IP3R}})}{z_{\text{Ca}} F (1 + B_{\text{C,ER}})} . \quad (4)$$

Dabei steht der Faktor ξ_{ER} für das geometrische Verhältnis zwischen der Oberfläche und dem Volumen des ER (Gleichung (18)). Die Bindekapazität der calciumbindenden Proteine im ER wird analog zu Gleichung (3) approximiert mit

$$B_{\text{C,ER}} = \frac{b_{\text{ER},0} K_{\text{ER,b}}}{(C_{\text{ER}} + K_{\text{ER,b}})^2} . \quad (5)$$

Es wird – ebenso wie bei Gleichung (3) – davon ausgegangen, dass die Calcium-Bindung und -Freisetzung durch calciumbindende Proteine im ER nicht auf der Zeitskala der Ionendynamik stattfindet, sondern deutlich schneller abläuft („rapid buffer approximation“).

Der Anteil der Konzentration an freiem Calcium im ER berechnet sich dann als

$$f_{C,ER} = \left[1 + \frac{b_{ER,0}}{C_{ER} + K_{ER,b}} \right]^{-1} \quad (6)$$

Im ER wird das Calcium durch die Proteine Calsequestrin und Calreticulin gebunden. Calsequestrin besitzt drei hochaffine Bindungsstellen und drei weniger affine Bindungsstellen für Calcium (Sanchez et al., 2012). Calreticulin besitzt zwei verschiedene Domänen. Eine davon hat mit $K = 0,01$ mM eine hohe Calciumaffinität, allerdings verfügt diese über eine nur geringe Bindekapazität mit $0,6\text{--}1$ M Ca^{2+} /M Protein (Baksh und Michalak, 1991). Die andere Domäne bindet mit einer niedrigen Affinität von $K = 2$ mM, aber mit einer hohen Bindekapazität von 18 M Ca^{2+} /M Protein (Baksh und Michalak, 1991). Da das Calreticulin mehr als 50% des Calciums im ER-Lumen bindet (Vandecaetsbeek et al., 2011), wird nur dieses im Modell berücksichtigt. Die Konzentration des freien Calciums ist im ER etwa 20-fach so hoch wie im Zytosol (Mogami et al., 1999), so dass der Anteil des freien ER-Calciums $f_{C,ER}$ 0,02% beträgt. Dieser Faktor kann mit einer Calciumbindungsstellen-Konzentration $b_{ER,0} = 30$ mM und einer Dissoziationskonstanten $K_{ER,b} = 0,1$ mM erreicht werden, wobei diese $K_{ER,b}$ einen Mittelwert zwischen beiden Calciumbindungsdomänen darstellt.

2.3 IP₃-Dynamik

Der „second messenger“ IP₃ wird in Folge einer T-Zell-Rezeptor-Stimulation durch die Phospholipase C generiert, deren Aktivierung calciumabhängig ist (Michal, 1999). Die Produktion des IP₃, hier P , wird daher beschrieben mit

$$\frac{dP}{dt} = \beta_P H(C, C_P, n_P) T(t) - \gamma_P P, \quad (7)$$

wobei β_P die Produktionsrate und γ_P die Abbaurate darstellt. Die Hill-Funktion ist definiert als

$$H(X, K, n) \equiv \frac{X^n}{X^n + K^n}, \quad (8)$$

mit K als derjenigen Konzentration der Substanz X , bei der die Hill-Funktion den halbmaximalen Wert erreicht, und n als Hill-Koeffizient, mit dem die Steigung der Hill-Funktion bestimmt wird.

Die Abbaurrate in Gleichung (7) wird über die Gleichgewichtsbedingungen („steady state“) für IP_3 in Gleichung (35) bestimmt. Die Produktionsrate durch die Phospholipase C ist abhängig von einem Anstieg der Calciumkonzentration (Michal, 1999) und wird durch die Hill-Funktion in Gleichung (7) reguliert. Dadurch kommt es zu einer positiven Rückkopplung zwischen Calcium und IP_3 . Die Produktionsrate wird durch Anpassung („fitting“) erhalten (siehe Kapitel III, 2.8) und hat einen entscheidenden Einfluss auf die rasche Erhöhung der Calciumkonzentration nach der Stimulation des T-Zell-Rezeptors. Die Produktion wird darüber hinaus durch die zeitabhängige Funktion $T(t)$ beeinflusst, welche den Grad der T-Zell-Rezeptor-Stimulation angibt. Im Ruhezustand wird davon ausgegangen, dass $T = 1$ gilt. Zur Stimulation des T-Zell-Rezeptors wird T variiert. Die Gleichgewichtskonzentration P_0 des IP_3 ist ein kritischer Parameter, der die Reaktivität der T-Zelle über die Aktivierung des IP_3R bestimmt. Daher wird der Parameter P_0 durch „fitting“ erhalten (Kapitel III, 2.8).

2.4 Membranpotential und Umkehrpotential

Das Ruhepotential der Plasmamembran liegt bei $V = -60$ mV (Ishida und Chused, 1993; Verheugen et al., 1995; Launay et al., 2004). Für das Modell wird dabei die Annahme getroffen, dass das Membranpotential durch die Calciumströme keine Änderung erfährt und $V = V_0$ gilt. Der elektrische Strom, der mit den fließenden Kationen korrespondiert, wird somit durch andere Ionen ausgeglichen. Des Weiteren wird vorausgesetzt, dass das Ruhepotential der ER-Membran ebenso -60 mV beträgt, so dass gilt: $V_{ER,0} = V_0 = -60$ mV. Das ER und das Zytosol sind folglich elektrisch ausgeglichen (Taylor und Dale, 2012). Der Calciumstrom aus dem ER führt zu geringen Fluktuationen des ER-Potentials (Marhl et al., 1997), die hier jedoch nicht berücksichtigt werden. Es wird demnach für das Modell $V_{ER} = V$ angenommen.

Mit dieser Annahme ist das Umkehrpotential ausschließlich vom chemischen Gradienten abhängig. Die Nernst-Gleichung wird verwendet, um das Umkehrpotential im Verlauf der dynamischen Änderungen der Calciumkonzentration zu berechnen:

$$\begin{aligned}\overline{V_C} &= \frac{RT}{z_{Ca}F} \ln \left(\frac{C_{ext}}{C} \right) - \Delta V_C \\ \overline{V_{C,ER}} &= \frac{RT}{z_{Ca}F} \ln \left(\frac{C_{ER}}{C} \right) - \Delta V_{C,ER}\end{aligned}\tag{9}$$

Dabei ist R die molare Rydberg-Gaskonstante mit $R = 8.315 \text{ J/(K mol)}$, T ist die Temperatur mit $T = 310 \text{ K}$ und F ist die Faraday-Konstante.

Für viele Ionenkanäle ist das Verhältnis zwischen dem Ionenstrom I und der Spannung V nicht so linear, wie es für die Calciumströme I_x in den Gleichungen (23) und (28) beschrieben wird. Das Umkehrpotential für den CRAC wird daher um $\Delta V_C = 78 \text{ mV}$ korrigiert. Damit kann eine korrekte lineare Extrapolation des Strom-Spannungs-Verhältnisses des CRAC mit einem Umkehrpotential von $\bar{V}_C \approx 50 \text{ mV}$ erreicht werden (Abb. 1 in Luik et al., 2008; Abb. 2 in Prakriya und Lewis, 2002). Diese Annahme gilt jedoch nur für Depolarisationen unterhalb von $V = 50 \text{ mV}$.

Mit dem Umkehrpotential für Calcium im ER ($\bar{V}_{C,ER}$) wird analog verfahren, so dass hier eine Korrektur $\Delta V_{C,ER}$ vorgenommen wird. Da dieser Wert nicht bekannt ist, wird er durch „fitting“ bestimmt (siehe Kapitel III, 2.8).

2.5 T-Zell-Geometrie

Eine exakte räumliche Analyse der Ionenströme in der T-Zelle wird mit dem hier realisierten Modellansatz, welcher auf Differentialgleichungen basiert, nicht durchgeführt. Dies ist damit zu begründen, dass es sich bei den T-Lymphozyten um sehr kleine Zellen handelt. Der Radius einer unaktivierten T-Zelle beträgt nur etwa $2,4 \mu\text{m}$ (Grissmer et al., 1993). Die T-Zelle kann sich bei Aktivierung auf etwa $7,5 \mu\text{m}$ vergrößern (Goldsby et al., 2003), jedoch wird diese Dynamik im Modellansatz nicht berücksichtigt. Eine lokale Erhöhung der Calciumkonzentration in einer T-Zelle führt sehr schnell zu einer durchschnittlichen Steigerung der Gesamt-Calciumkonzentration im Zytosol (Feske, 2007; Martin et al., 2012). Im Modell wird daher davon ausgegangen, dass aufgrund der geringen Zellgröße des T-Lymphozyten rasch ein Ausgleich der lokalen Konzentrationsgradienten stattfindet. Es werden deshalb die durchschnittlichen zytosolischen Calciumkonzentrationen beziehungsweise die durchschnittlichen Calciumkonzentrationen im ER berücksichtigt. Die Dynamik der Konzentrationen wird in Abhängigkeit der separat betrachteten Ionenströme durch die an der Konzentrationsänderung beteiligten Transmembranproteine und deren entsprechende Dichten errechnet. Der Ionenstrom I_x der durch den Kanal oder die Pumpe fließt, wird jeweils mit der zugehörigen Proteindichte ρ_x multipliziert. Die aus den Calciumströmen resultierende Calciumdynamik im Zytosol und im ER steht folglich aufgrund der Berücksichtigung der Proteindichten im Zusammenhang mit der Oberflächengröße der Kompartimente. Damit die Ionenkonzentration richtig

berechnet werden kann, muss für jedes Transmembranprotein die Relation zwischen dem Calciumstrom I_x und der Proteindichte ρ_x berücksichtigt werden.

2.5.1 Volumen des Zytoplasmas und Berechnung der Zelloberfläche

Der Radius kann als fester Parameter zur Errechnung des Zellvolumens und der Zelloberfläche dienen. Für die Veränderungen der Calciumkonzentration im Zytoplasma ist jedoch nicht das Zellvolumen, sondern das zytoplasmatische Volumen V_{cyt} entscheidend. Dieses ergibt sich aus dem Zellvolumen V_{cell} abzüglich der Volumina des Zellkerns (V_{nucleus}) und des ER (V_{ER}). Um eine Überparametrisierung zu vermeiden, wird auf eine Darstellung der Mitochondrien – sowohl hinsichtlich ihrer räumlichen Komponente als auch in ihrer Funktion als Calciumspeicher – im Modell verzichtet.

Demnach führen der Zellkern und das ER zu einer Verkleinerung des zytoplasmatischen Volumens:

$$V_{\text{cyt}} = V_{\text{cell}} - \tilde{V}_{\text{ER}} - V_{\text{nucleus}}, \quad (10)$$

Für den Zellkern der T-Lymphozyten kann von einem Radius R_{nucleus} von

$$R_{\text{nucleus}} = f_R R_{\text{cell}} \quad (11)$$

mit einem Faktor $f_R \approx 0,8$ für humane T-Zellen (Kono et al., 2013) beziehungsweise mit einem $f_R \approx 0,25$ für Jurkat-T-Zellen ausgegangen werden. Das Volumen des ER V_{ER} kann anteilig am Zellvolumen mit

$$\tilde{V}_{\text{ER}} = f_V V_{\text{cell}} \quad (12)$$

angenähert werden, dabei sind für den Faktor f_V unterschiedliche Werte zu finden. Es findet sich generell für T-Zellen $f_V \approx 0,1$ (Alberts et al., 1994). Für Jurkat-T-Zellen hingegen wird das Verhältnis zwischen dem Zellvolumen V_{cell} und dem ER-Volumen V_{ER} durch den Faktor $f_V \approx 0.01$ (Bergling et al., 1998) dargestellt, welcher auch im Modell verwendet wird.

Das zytoplasmatische Volumen ergibt sich demnach aus:

$$V_{\text{cyt}} = V_{\text{cell}} (1 - f_V - f_R^3). \quad (13)$$

2.5.2 Oberfläche des ER

Für die Oberfläche des weitverzweigten ER A_{ER} existieren keine exakten Literaturdaten, daher wird folgende Näherung verwendet:

$$A_{ER} = f_A \tilde{A}_{ER} \equiv 4\pi f_A \left(\frac{3 \tilde{V}_{ER}}{4\pi} \right)^{2/3}. \quad (14)$$

Die kompliziert gefaltete und verzweigte Oberfläche des ER wird mit einer Kugel der Oberfläche \tilde{A}_{ER} und des Volumens V_{ER} approximiert und – um die reale ER-Oberfläche zu simulieren – mit dem Faktor f_A multipliziert. Der Faktor bezieht sich auf die Faltung des ER und aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen einer T-Zelle kann für das Ausmaß der Oberflächenfaltung des ER ein Faktor von $f_A = 30$ angenommen werden (Bergling et al., 1998). Dabei wird für das Modell lediglich das Produkt aus f_A mit $f_V^{2/3}$ berücksichtigt. Die beiden Parameter sind entsprechend redundant, werden jedoch aufgrund ihrer physiologischen Bedeutung getrennt betrachtet.

2.5.3 T-Zell-Größe und Volumen des ER

Die Größe eines humanen T-Lymphozyten kann aus der Membrankapazität von $C_m = 0,028 \text{ pF}/\mu\text{m}^2$ (Gentet et al., 2000; Göpel et al., 2004; Su et al., 2005) unter Verwendung einer Gesamtzellkapazität von $C_{cell} \approx 2 \text{ pF}$ (Grissmer et al., 1993; Fomina et al., 2000) errechnet werden. Mit $C_{cell}/A_{cell} = C_m$ erhält man den Radius R_{cell} :

$$R_{cell} = \sqrt{\frac{C_{cell}}{4\pi C_m}}. \quad (15)$$

Es resultiert $R_{cell} \approx 2,4 \mu\text{m}$ und dieser Wert korrespondiert mit der Zelloberfläche, für die $A_{cell} = 72,4 \mu\text{m}^2$ bestimmt wurde (Gentet et al., 2000; Göpel et al., 2004; Su et al., 2005).

Dem Calciumdynamik-Modell liegen Experimente zugrunde, die mit Jurkat-T-Zellen durchgeführt wurden. Diese Zellen sind etwas größer als normale T-Lymphozyten und das Zellvolumen wurde mit 2 pl angegeben (Bautista et al., 2002). Daraus ergibt sich für das Calciumdynamik-Modell ein Radius von $R_{cell} = 8 \mu\text{m}$ und eine Zelloberfläche von $A_{cell} = 804,2 \mu\text{m}^2$.

Mit einem gegebenen Zellradius R_{cell} und den Faktoren f_V , f_R und f_A (Kapitel III, 2.5.1 und 2.5.2) können die Oberflächen-Volumen-Verhältnisse, die in den Gleichungen (1) und (4)

benötigt werden, berechnet werden. Die Relationen sind über das Verhältnis ξ zwischen der Zelloberfläche A_{cell} und dem zytosolischen Volumen V_{cyt} beziehungsweise über das Verhältnis ξ_{ERC} zwischen der ER-Oberfläche A_{ER} und dem zytosolischen Volumen V_{cyt} sowie über das Verhältnis ξ_{ER} zwischen der ER-Oberfläche A_{ER} und dem ER-Volumen V_{ER} gegeben:

$$\xi = \frac{A_{\text{cell}}}{V_{\text{cyt}}}, \quad (16)$$

$$\xi_{\text{ERC}} = \frac{A_{\text{ER}}}{V_{\text{cyt}}}, \quad (17)$$

$$\xi_{\text{ER}} = \frac{A_{\text{ER}}}{\tilde{V}_{\text{ER}}}. \quad (18)$$

Somit können die Zelloberfläche A_{cell} und das zytosolische Volumen V_{cyt} folgendermaßen dargestellt werden:

$$A_{\text{cell}} = 4\pi R_{\text{cell}}^2, \quad (19)$$

$$V_{\text{cyt}} = \frac{4}{3}\pi R_{\text{cell}}^3 (1 - f_V - f_R^3). \quad (20)$$

Für das ER-Volumen \tilde{V}_{ER} und die ER-Oberfläche A_{ER} gilt:

$$\tilde{V}_{\text{ER}} = \frac{4}{3}\pi f_V R_{\text{cell}}^3, \quad (21)$$

$$A_{\text{ER}} = 4\pi f_A \left(\frac{3\tilde{V}_{\text{ER}}}{4\pi} \right)^{2/3}. \quad (22)$$

2.6 Transmembranproteine

2.6.1 „Calcium-Release Activated Channel“ (CRAC)

Der Calciumstrom durch den CRAC wird durch den elektrochemischen Gradienten bestimmt und ist negativ, da Calcium aus dem Extrazellulärraum in das Zytosol diffundiert:

$$I_{\text{CRAC}} = \overline{g_{\text{CRAC}}} (V - \overline{V_C}). \quad (23)$$

Dieser Ansatz orientiert sich am Modell von Martin et al. (Martin et al., 2012). Dabei ist die Näherung über das Ohmsche Gesetz nur innerhalb bestimmter Grenzen des Membranpotentials möglich. Bezüglich des CRAC ist diese Näherung für Depolarisationen der Plasmamembran, die das Umkehrpotential von $\overline{V_C} \approx 50$ mV übersteigen (siehe Kapitel III, 2.4), nicht mehr geeignet.

2.6.1.1 Leitfähigkeit des CRAC

Die Leitfähigkeit eines einzelnen CRAC ist sehr klein und die maximale Leitfähigkeit $\overline{g_{\text{CRAC}}}$ liegt bei 2 fS (Zweifach und Lewis, 1993).

2.6.1.2 Rekrutierung der CRAC

Die Dichte der aktiven CRAC in der Plasmamembran ergibt sich als dynamische Funktion in Abhängigkeit der Calciumkonzentration im ER (Abb. 1C in Luik et al., 2008) und kann mit

$$\frac{d\rho_{\text{CRAC}}}{dt} = \frac{\overline{\rho_{\text{CRAC}}} - \rho_{\text{CRAC}}}{\tau_{\text{CRAC}}} \quad (24)$$

beschrieben werden. Dabei gilt für die CRAC-Dichte

$$\overline{\rho_{\text{CRAC}}} = \rho_{\text{CRAC}}^- + (\rho_{\text{CRAC}}^+ - \rho_{\text{CRAC}}^-) (1 - H(C_{\text{ER}}, C_{\text{CRAC}}, n_{\text{CRAC}})) \quad (25)$$

mit der ER-Calciumkonzentration bei halbmaximaler Aktivierung $C_{\text{CRAC}} = 169$ μM und dem Hill-Koeffizienten $n_{\text{CRAC}} = 4,2$ (Abb. 1C in Luik et al., 2008).

Wird anstelle des Verhältnisses zwischen der CRAC-Dichte und der ER-Calciumkonzentration die Beziehung zwischen der CRAC-Dichte und der STIM1-Wanderungsbewegung (in Richtung der Plasmamembran) herangezogen, so erhält man mit $C_{\text{CRAC}} = 187$ μM und $n_{\text{CRAC}} = 3,8$ eine vergleichbare Relation (Abb. 2C in Luik et al.,

2008). Die Ähnlichkeit der beiden Relationen bestätigt, dass die CRAC in Abhängigkeit des ER-Calciumgehalts durch STIM1 rekrutiert und aktiviert werden (Luik et al., 2008). Für das Modell wird der Zusammenhang zwischen der Dichte der CRAC in der Plasmamembran und der Calciumkonzentration im ER verwendet (siehe Gleichung (25)).

2.6.1.3 Dichte der CRAC in der Plasmamembran

In Gleichung (25) wird durch ρ_{CRAC}^+ und ρ_{CRAC}^- jeweils die obere und die untere Grenze der Dichte der aktiven CRAC repräsentiert. Der Gleichgewichtswert $\rho_{\text{CRAC},0}$, bei dem sich die CRAC-Dichte während des ruhenden T-Zell-Zustands befindet, ist nicht aus Experimenten bekannt und der Wert wird daher durch Anpassung eingestellt (Kapitel III, 2.8). Dabei wird auf die Calciumdynamik nach erfolgter T-Zell-Rezeptor-Stimulation Bezug genommen.

Die Dichte der CRAC nach einer Aktivierung mit Phytohämagglutinin nimmt um das 9-fache zu (Prakriya und Lewis, 2002) und bestimmt damit ρ_{CRAC}^+ . Eine 10-fache Zunahme des Gesamt-Calciumeinstroms durch die CRAC wird nach schrittweiser Reduktion der Calciumkonzentration im ER beobachtet (Abb. 1C in Luik et al., 2008).

Daraus ergibt sich

$$\rho_{\text{CRAC}}^+ = f_{\text{CRAC}} \rho_{\text{CRAC},0}, \quad (26)$$

wobei ρ_{CRAC}^+ durch Parameter-Anpassung innerhalb der Grenzen, die durch die Experimente vorgegeben werden, bestimmt wird (Kapitel III, 2.8). Ein Wert für ρ_{CRAC}^- ist nicht bekannt und wird mit Gleichung (36) im Rahmen der Bestimmung des Gleichgewichtszustands („steady state“) festgelegt.

2.6.1.4 Zeitlicher Rahmen der CRAC-Rekrutierung

Die Zeitdauer der CRAC-Rekrutierung kann aus der Zunahme des Calciumeinstroms in das Zytosol durch die CRAC im zeitlichen Verlauf abgeschätzt werden (Abb. 1A und C in Luik et al., 2008). Bereits unterhalb von 100 s ist die Calciumkonzentration im ER so weit gesunken (Abb. 1A in Luik et al., 2008), dass ein deutlicher Calciumstrom durch die CRAC resultiert, der im halbmaximalen Bereich des möglichen Einstroms liegt (Abb. 1C in Luik et al., 2008). So erhält man eine obere Grenze $\tau_{\text{CRAC}} < 100$ s für die Zeit bis zum Erreichen der Aktivierung. Es kann davon ausgegangen werden, dass in dieser Zeit die Rekrutierung der ORAI-Proteine über die STIM1 erfolgt. Es ist nicht anzunehmen, dass diese Zeit im Zusammenhang mit der Öffnung der Kanäle steht, denn in der Regel liegen solche Zeiten im Bereich von Millisekunden (Hille, 1992). Die Zeit τ_{CRAC} wird auf 5 s gesetzt und liegt damit im Bereich der Literaturwerte (Wu et al., 2006).

Die Zeitdauer bis zu einer Inaktivierung der CRAC liegt im Bereich von 1000 s (Zweifach und Lewis, 1995a; Fomina et al., 2000) und ist damit deutlich länger als die Laufzeiten der Experimente zur Calciumdynamik, auf denen die vorliegende Arbeit basiert. Daher wird eine Inaktivierung der CRAC im Modell nicht berücksichtigt. Für die Simulationen wird angenommen, dass die Reduktion der aktiven CRAC ein sekundärer Effekt ist, der aus der Wiederbefüllung des ER-Calciumspeichers resultiert.

2.6.2 Inositoltrisphosphat-Rezeptor (IP₃R)

Wird der IP₃R durch IP₃ und zytosolisches Calcium aktiviert, so strömt Calcium aus dem ER-Lumen in das Zytosol (CICR). Dadurch sinkt die Calciumkonzentration im ER (Bezprozvanny et al., 1991; Liou et al. 2005; Taylor und Tovey, 2010). Die IP₃R besitzen Bindungsstellen für IP₃ und Calcium und der Aktivierungsprozess unterliegt einer komplexen Kooperativität (Berridge und Irvine, 1984; De Young und Keizer, 1992; Berridge, 1993). Für das Modell werden die Aktivierungs- und Inaktivierungsprozesse des IP₃R betrachtet. Die Leitfähigkeit des IP₃R wird durch die IP₃- und calciumabhängige Öffnungswahrscheinlichkeit bestimmt, die sich im Experiment als glockenförmige logarithmische Kurve darstellt (Bezprozvanny et al., 1991; Foscett et al., 2007).

2.6.2.1 Öffnungswahrscheinlichkeit des IP₃R

Die Öffnungswahrscheinlichkeit des IP₃R kann als Produkt des Aktivierungsterms g_{IP3R} und des Inaktivierungsterms h_{IP3R} (Gleichung (28) und (29)) beschrieben werden. Die Eigenschaften der Öffnung des IP₃R wurden experimentell quantitativ für Eizellen des *Xenopus laevis* bestimmt (Mak et al., 1998; Foscett et al., 2007). Für das Modell wird davon ausgegangen, dass die so ermittelten IP₃R-Einzelkanal-Charakteristika auf die IP₃R in T-Lymphozyten übertragen werden können. Die experimentell bestimmte IP₃R-Dynamik kann für den Gleichgewichtszustand der T-Zelle mit dem Mak-McBride-Foscett-Modell beschrieben werden (Mak et al., 1998; Foscett et al., 2007):

$$\begin{aligned} g_{IP3R} &= g_{IP3R,max} H(C, C_{IP3R,act}, n_{IP3R,act}) \\ h_{IP3R} &= H(C_{IP3R,inh}, C, n_{IP3R,inh}) \\ C_{IP3R,inh} &= \overline{C_{IP3R,inh}} H(P, P_{IP3R,C}, n_{IP3R,C}). \end{aligned} \quad (27)$$

Dabei ist die maximale Öffnungswahrscheinlichkeit $g_{IP3R,max} = 0,81$ und die Calciumkonzentration bei halbmaximaler Aktivierung beträgt $C_{IP3R,act} = 0,21 \mu M$ mit einem Hill-Koeffizienten von $n_{IP3R,act} = 1,9$. Der Hill-Koeffizient der Inaktivierungsfunktion beträgt

$n_{IP_3R,inh} = 3,9$ und die Calciumkonzentration bei halbmaximaler Inaktivierung ($C_{IP_3R,inh}$) wird als separate IP_3 -abhängige Funktion dargestellt. Darin ist die maximale Calciumkonzentration bei halbmaximaler Inaktivierung $\bar{C}_{IP_3R,inh} = 52 \mu M$ und die IP_3 -Konzentration der halbmaximalen Aktivierung beträgt $P_{IP_3R,C} = 0,05 \mu M$ mit einem Hill-Koeffizienten von $n_{IP_3R,C} = 4$ (Mak et al., 1998). Die Calcium- und IP_3 -Abhängigkeit, die im Modell im Gleichgewichtszustand durch das Gleichungssystem (27) repräsentiert wird, ist in Abbildung 6 dargestellt und entspricht den experimentellen Ergebnissen (Mak et al., 1998). Die Beeinflussung des IP_3R durch den „second messenger“ IP_3 erfolgt dabei, wie aus Abbildung 6 und den Gleichungen für h_{IP_3R} bzw. $C_{IP_3R,inh}$ (Gleichungssystem (27)) ersichtlich ist, über die Regulation der IP_3R -Inaktivierung (Foskett et al., 2007). Bei niedrigen Calciumkonzentrationen wirkt sich diese Beeinflussung kaum aus und die IP_3R -Aktivierung bleibt trotz Veränderungen der IP_3 -Konzentration – innerhalb eines Bereichs der IP_3 -Gleichgewichtskonzentration bis zu 50 nM – unverändert.

Für die IP_3 -Gleichgewichtskonzentration in einer T-Zelle finden sich in der Literatur Werte zwischen 100 nM und 1 μM (Tab. 1 in Guse et al., 1992). Diese Konzentrationen liegen jedoch in einem IP_3 -Bereich, in dem der Typ-1- IP_3R eine Sättigung erreicht und keine Dynamik zeigt (Sneyd und Falcke, 2005; Kowalewski et al., 2006). Sie werden daher nicht für die Simulationen verwendet. Für das Modell wird eine IP_3 -Gleichgewichtskonzentration von 5–10 nM angenommen. Damit wird sichergestellt, dass eine Zunahme der IP_3 -Konzentration im Modell, wie in Abbildung 6 gezeigt, die IP_3R -Öffnungswahrscheinlichkeit beeinflusst. So können die experimentellen Resultate korrekt repräsentiert werden (Mak et al., 1998; Kowalewski et al., 2006; Foskett et al., 2007).

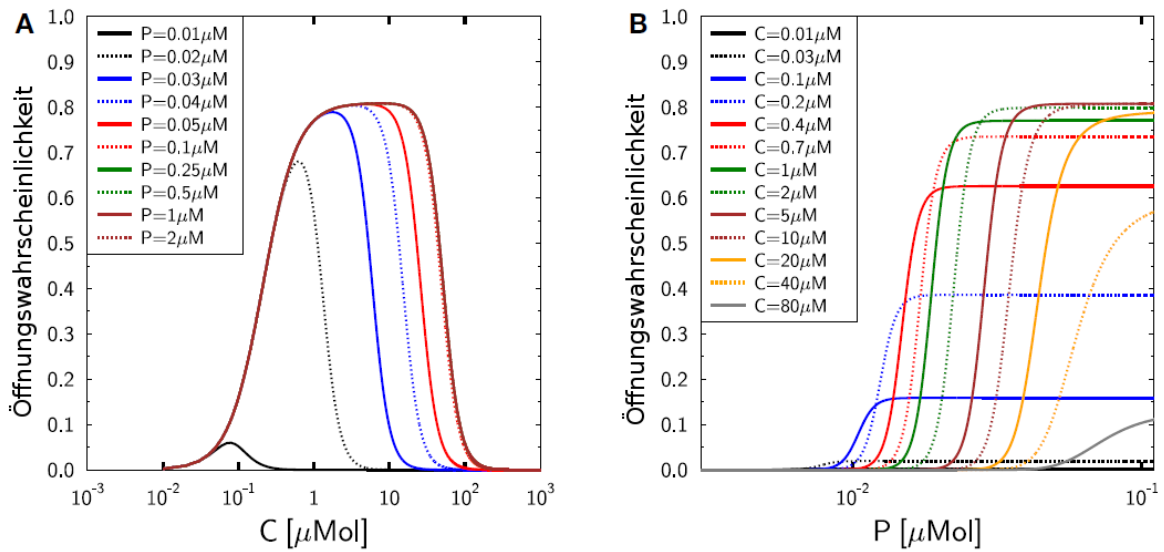


Abb. 6: Aktivierung und Inaktivierung des IP₃R in Abhängigkeit von Calcium und IP₃

Simulation der experimentellen Daten (Mak et al., 1998) unter Verwendung des Mak-McBride-Foskett-Modells, siehe Gleichungssystem (27).

(A) IP₃R-Öffnungswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit der Konzentration des freien Calciums (C) für verschiedene IP₃-Konzentrationen (P)

(B) IP₃R-Öffnungswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit der IP₃-Konzentration (P) für verschiedene Konzentrationen des freien Calciums (C)

2.6.2.2 Calciumstrom aus dem ER durch den IP₃R

Unter Verwendung der Öffnungswahrscheinlichkeit des IP₃R im Gleichgewichtszustand der T-Zelle („steady state“), die sich als Produkt aus g_{IP3R} und h_{IP3R} darstellt (Abb. 6 und Gleichung (28)), kann der Calciumstrom aus dem ER in das Zytosol durch den IP₃R bestimmt werden. Der Calciumstrom folgt dabei dem elektrochemischen Gradienten zwischen dem Zytosol und dem ER und ist somit negativ:

$$I_{IP3R} = \overline{g}_{IP3R} g_{IP3R} h_{IP3R} (V - V_{ER} - \overline{V}_{C,ER}) \quad (28)$$

mit einer maximalen Einzelkanal-Leitfähigkeit von $\overline{g}_{IP3R} = 0,064$ pS (Foskett et al., 2007). Der Term $V - V_{ER}$ bezieht sich auf die Potentialdifferenz zwischen dem ER und dem Zytosol, und $\overline{V}_{C,ER}$ ist das Umkehrpotential von Calcium, das mit der Nernst-Gleichung (9) berechnet wird. Es wird ein elektrisch ausgeglichenes Verhältnis zwischen dem Zytosol und dem ER vorausgesetzt, so dass $V = V_{ER}$ gegeben ist.

2.6.2.3 Dynamik der Aktivierung und Inaktivierung des IP₃R

Die Größen der Aktivierung g und der Inaktivierung h werden im Modell dynamisch behandelt:

$$\begin{aligned}\frac{dg_{\text{IP}_3\text{R}}}{dt} &= \frac{g_{\text{IP}_3\text{R},\text{max}} H(C, C_{\text{IP}_3\text{R},\text{act}}, n_{\text{IP}_3\text{R},\text{act}}) - g_{\text{IP}_3\text{R}}}{\tau_{\text{IP}_3\text{R}}} \\ \frac{dh_{\text{IP}_3\text{R}}}{dt} &= \frac{H(C_{\text{IP}_3\text{R},\text{inh}}, C, n_{\text{IP}_3\text{R},\text{inh}}) - h_{\text{IP}_3\text{R}}}{\theta_{\text{IP}_3\text{R}}}.\end{aligned}\quad (29)$$

Im Gleichgewichtszustand nähern sich $g_{\text{IP}_3\text{R}}$ und $h_{\text{IP}_3\text{R}}$ (Gleichungssystem (29)) den ersten beiden Gleichungen im Gleichungssystem (27). Die Funktion $C_{\text{IP}_3\text{R},\text{inh}}$ wird im Gleichungssystem (29) im Quasi-Gleichgewichtszustand verwendet (siehe dritte Gleichung im Gleichungssystem (27)).

2.6.2.4 Aktivierungszeit des IP₃R

Die Zeitskala für die Aktivierung und Inaktivierung des IP₃R (gemessen in Leberzellen von Ratten) ist von der IP₃-Konzentration abhängig (Marchant und Taylor, 1998). Die Aktivierungszeit variiert zwischen 100 und 500 ms bei IP₃-Konzentrationen zwischen 10 μM und 400 nM (Abb. 1 in Marchant und Taylor, 1998). Diese zeitliche Verzögerung stimmt mit einer IP₃-abhängigen Verspätung der IP₃R-Öffnung überein, wie sie mit einer Zeitspanne von $1\text{ s} > \tau_{\text{IP}_3\text{R}} > 100\text{ ms}$ für basophile Leukämie-Zellen angegeben ist (Meyer et al., 1990). Es wird davon ausgegangen, dass sich der IP₃R in Jurkat-T-Zellen analog verhält, so dass im Modell für die Aktivierungszeit $\tau_{\text{IP}_3\text{R}} = 100\text{ ms}$ angenommen wird.

2.6.2.5 Inaktivierungszeit des IP₃R

Eine Inaktivierung des IP₃R kann durchschnittlich nach weniger als zwei Minuten beobachtet werden (Mak und Foskett, 1997). In experimentellen Messungen liegt die IP₃R-Inaktivierungszeit in einem Bereich von 200–450 ms (Marchant und Taylor, 1998). Als Parameter im Modell wird daher für die Zeit bis zur Inaktivierung des IP₃R der Wert $\theta_{\text{IP}_3\text{R}} = 300\text{ ms}$ verwendet (Marchant und Taylor, 1998).

2.6.2.6 Dichte der IP₃-Rezeptoren in der ER-Membran

Die Dichte der IP₃R in der ER-Membran von Jurkat-T-Zellen ist nicht bekannt und wird im Modell durch die Bedingungen des Gleichgewichtszustands (siehe Gleichung (34)) vorgegeben (Kapitel III, 2.7).

2.6.3 Plasmamembran-Calcium-ATPase (PMCA)

Die PMCA ist eine ATP-getriebene Pumpe, die Calcium aus der Zelle in den Extrazellulärraum transportiert (Juhaszova et al., 2000; Bautista et al., 2002). Da die ATP-Konzentration im Modell nicht berücksichtigt wird (siehe Kapitel III, 1.2), ist die Aktivität der PMCA hauptsächlich von der Calciumkonzentration in der T-Zelle abhängig. Der Calciumausstrom durch die PMCA wird modelliert mit:

$$I_{\text{PMCA}} = \overline{I_{\text{PMCA}}} g_{\text{PMCA}}, \quad (30)$$

Dabei ist

$$\frac{dg_{\text{PMCA}}}{dt} = \frac{H(C, C_{\text{PMCA}}, n_{\text{PMCA}}) - g_{\text{PMCA}}}{\tau_{\text{PMCA}}}. \quad (31)$$

Der maximale Calciumstrom $\overline{I_{\text{PMCA}}}$ ist positiv, da Calcium aus der Zelle in den Extrazellulärraum transportiert wird. Der Hill-Koeffizient beträgt $n_{\text{PMCA}} = 2$ (Caride et al., 2001b).

2.6.3.1 Umsetzungsrate der PMCA und maximaler Calciumstrom

Die Umsetzungsrate der PMCA beträgt etwa 30 Hz (Juhaszova et al., 2000), womit eine Aktivitätsrate von $k_a = 0,03/\text{ms}$ korrespondiert (Sherman et al., 1988). Diese Umsetzungsrate kann in einen elektrischen Strom umgerechnet werden, wobei dabei vorausgesetzt wird, dass pro Pumpenaktivität zwei elektrische Ladungen transportiert werden. Damit erhält man für den maximalen Calciumstrom durch die PMCA:

$$\overline{I_{\text{PMCA}}} = z_{\text{Ca}} e k_a = 60 \cdot 1,6 \cdot 10^{-19} \text{ C/s} \approx 10^{-17} \text{ A} = 10^{-5} \text{ pA}.$$

2.6.3.2 Calciumabhängige Aktivierung der PMCA

Ein typischer Wert für die Calciumkonzentration bei halbmaximaler Aktivierung liegt, unter gegebenen Bedingungen mit 540 nM Calmodulin, bei $C_{\text{PMCA}} = 0,1 \text{ } \mu\text{M}$ (Elwess et al., 1997). Die Isoformen PMCA2a und PMCA2b liegen sogar bei $C_{\text{PMCA2a,b}} < 0,1 \text{ } \mu\text{M}$.

Die überwiegend vorliegende PMCA in Jurkat-T-Zellen ist jedoch die Isoform 4b (Abb. 6B in Caride et al., 2001a) mit $C_{\text{PMCA4b}} \approx 0,2 \text{ } \mu\text{M}$ (Abb. 2 in Caride et al., 2001a), daher wird dieser Wert im Modell verwendet.

2.6.3.3 Abhängigkeit der PMCA von Calmodulin

Der Wert für die Calciumkonzentration bei halbmaximaler Aktivierung hängt von der Calmodulinkonzentration ab (Cox et al., 1982; Elwess et al., 1997; Caride et al., 2001a). Bei einer Calmodulinkonzentration oberhalb von $1 \text{ } \mu\text{M}$, wie es im Modell der Fall ist,

können alle PMCA-Isoformen voll aktiviert werden (Elwess et al., 1997; Graupner et al., 2005). Daher kann auch die Calmodulin-Abhängigkeit der PMCA4b im T-Zell-Modell vernachlässigt werden.

2.6.3.4 Verzögerung der PMCA-Aktivierung

Die Bindung von Calcium an die PMCA ist ein vergleichsweise schneller Prozess mit einer Geschwindigkeitskonstante von $> 3/s$ (Forge et al., 1993). Dennoch setzt die Aktivierung der PMCA bei vielen Isoformen mit Verzögerung ein, so auch bei der Isoform 4b in T-Zellen (Caride et al., 2001a; Bautista et al., 2002). Die Geschwindigkeitskonstante der PMCA-Aktivierung nach einer Stimulation mit 500 nM Calcium liegt im Bereich von 0,02/s (Caride et al., 2001a), was eine Verzögerung der PMCA-Aktivierung von $\tau_{PMCA} = 50$ s in Gleichung (31) bedingt. Diese Verzögerung wird mit der calmodulin- und calcium-abhängigen Aktivierung in Verbindung gebracht (Caride et al., 2001a; Bautista et al., 2002). Da der genaue Mechanismus nicht bekannt ist, wird die Aktivierungszeit τ_{PMCA} in Gleichung (31) auf phänomenologischer Basis modelliert.

2.6.3.5 Dichte der PMCA-Pumpen in der Plasmamembran

Für T-Zellen ist kein genauer Wert für die Dichte der PMCA in der Plasmamembran bekannt. Die Bestimmung erfolgt daher aus dem Gleichgewichtszustand in Gleichung (33) (Kapitel III, 2.7).

2.6.4 **Sarkoendoplasmatische Retikulum-Calcium-ATPase (SERCA)**

Durch die SERCA wird eine hohe Calciumkonzentration im ER aufrechterhalten, so dass das ER als Calciumspeicher fungieren kann. Es wird angenommen, dass die Aktivität der SERCA sich rasch an Veränderungen der zytosolischen Calciumkonzentration anpasst. Der positive Calciumstrom aus dem Zytosol in das ER durch die SERCA kann beschrieben werden durch

$$I_{SERCA} = \overline{I_{SERCA}} H(C, C_{SERCA}, n_{SERCA}). \quad (32)$$

Dabei werden jeweils zwei Calciumionen per umgesetzttem ATP transportiert (Wolosker et al., 1998). Es gibt unterschiedliche Isoformen der SERCA, wobei in Jurkat-T-Zellen die SERCA2b die überwiegende Isoform darstellt (Chandrasekera et al., 2009).

2.6.4.1 Umsetzungsrate der SERCA und maximaler Calciumstrom

Für die meisten SERCA-Isoformen liegt die Umsetzungsrate im Bereich von $k_a = 10$ Hz. Daraus ergibt sich

$$\bar{I}_{SERCA} = z_{Ca} e k_a = \bar{I}_{SERCA} = z_{Ca} e k_a = 6 \cdot 10^{-6} \text{ pA}.$$

Die Umsetzungsrate der Isoform SERCA2b liegt jedoch bei $k_a = 5$ Hz (Lytton et al., 1992), so dass als Maximalstrom $\bar{I}_{SERCA} = 3 \cdot 10^{-6}$ pA im Modell eingesetzt wird.

2.6.4.2 Calciumabhängige Aktivierung der SERCA

Für die SERCA-Isoformen 1, 2a und 2b kann generell mit einer Calciumkonzentration bei halbmaximaler Aktivierung von $C_{SERCA} = 0,4 \text{ } \mu\text{M}$ und mit einem Hill-Koeffizienten von $n_{SERCA} = 2$ eine gute Näherung erzielt werden (Abb. 4 in Lytton et al., 1992). Die Isoform SERCA3 liegt im Vergleich bei $C_{SERCA} = 1 \text{ } \mu\text{M}$ bei gleichem Hill-Koeffizienten (Lytton et al., 1992). Die SERCA2b, die in Jurkat-T-Zellen vorliegt, ist eine Isoform, die bereits bei relativ geringer Calciumkonzentration aktiv wird und deren spezifische Calciumkonzentration bei halbmaximaler Aktivierung als $C_{SERCA2b} = 0,25 \text{ } \mu\text{M}$ mit einem Hill-Koeffizienten von $n_{SERCA2b} = 2$ gemessen wurde (Chandrasekera et al., 2009). Diese Werte für die SERCA2b werden im Modell verwendet.

2.6.4.3 Dichte der SERCA-Pumpen in der ER-Membran

Die Expression der SERCA-Proteine verändert sich mit der Aktivierung der T-Zelle (Launay et al., 1997). Allerdings existieren keine genauen Angaben zur Dichte der SERCA-Pumpen in der Plasmamembran, daher wird dieser Parameter im Modell durch „fitting“ (siehe Kapitel III, 2.8) bestimmt.

2.7 Gleichgewichtszustand („steady state“)

Der Gleichgewichtszustand der T-Zelle wird bestimmt, indem die Zeitableitungen der dynamischen Größen (1), (4), (7) und (24) auf Null gesetzt werden. Damit können die Gleichungen für C , C_{ER} , P und ρ_{CRAC} umgestellt werden und es ergibt sich daraus für die Parameter ρ_{PMCA} , ρ_{IP3R} , γ_P und ρ_{PMCA} :

$$\rho_{PMCA} = - \frac{\rho_{CRAC,0} I_{CRAC,0}}{I_{PMCA,0}}, \quad (33)$$

$$\rho_{IP3R} = - \frac{\rho_{SERCA} I_{SERCA,0}}{I_{IP3R,0}}, \quad (34)$$

$$\gamma_P = \frac{\beta_P H(C_0, C_P, n_P)}{P_0}, \quad (35)$$

$$\rho_{CRAC}^- = \frac{\rho_{CRAC,0}}{H(C_{ER,0}, C_{CRAC}, n_{CRAC}) [1 - f_{CRAC} (1 - H(C_{ER,0}, C_{CRAC}, n_{CRAC}))]}, \quad (36)$$

Dabei bezieht sich $I_{X,0}$ auf die Calciumströme durch die jeweiligen Transmembranproteine X, die sich im Gleichgewichtszustand X_0 befinden.

2.8 Parameteranpassung („fitting“)

Das Modell, welches über die Gleichungen (1, 2, 4, 5, 7, 8, 16–25, 27–32) definiert wird, ist als C++-Code implementiert und wird mit einem Runge-Kutta-Algorithmus 4. Ordnung mit angepasster Schrittweite gelöst. Da nicht alle Parameter aus Experimenten übernommen werden können oder aus den Bedingungen des Gleichgewichtszustands resultieren, wird Abbildung 1A in Bautista et al. verwendet, um die verbleibenden freien Parameter zu bestimmen (Abb. 1A in Bautista et al., 2002). Dabei wird das „fitting“ in zwei Schritten vorgenommen: Zunächst wird ein Differentieller Evolutions-Algorithmus nach Storn und Price (Storn und Price, 1997) in den C++-Code des Modells auf Basis derjenigen Parameter in Tabelle 1, die nicht durch die Bedingungen des Gleichgewichtszustands bestimmt werden können, eingearbeitet. Die Parameter werden innerhalb experimentell vorgegebener Grenzen (falls vorhanden) variiert, wobei die Grenzwerte im Code implementiert sind.

Die Qualität der Anpassung in Bezug auf Abbildung 1A in Bautista et al. ergibt sich aus der mittleren quadratischen Abweichung

$$QI = \frac{1}{N} \sqrt{\sum_{i=1}^N \frac{(X_i - E_i)^2}{E_i^2}}, \quad (37)$$

wobei X_i und E_i die jeweiligen Werte aus Simulation und Experiment darstellen.

In einem zweiten Schritt wird die erste Näherung einer Sensitivitätsanalyse unterzogen, in der jeder Parameter um 10% variiert wird. Dabei wird die Auswirkung dieser Veränderung auf QI beobachtet. Die drei unbekannten Proteindichten ρ_{SERCA} , $\rho_{\text{CRAC},0}$ und ρ_{CRAC}^+ und die drei sensitiven Parameter P_0 und β_P sowie $\Delta V_{\text{C,ER}}$ werden für die Feinanpassung der ersten Näherung unter Zuhilfenahme des gleichen Differentiellen Evolutions-Algorithmus benutzt. Diese Parameter werden in Tabelle 1 entsprechend als *Variable* bezeichnet.

Die endgültige Anpassung erreicht $QI = 0,1002$ mit $N = 22$. Die Sensitivitätsanalyse wird für diesen „fit“ wiederholt und der Einfluss eines jeden Parameters auf QI (Gleichung (37)) ist in Tabelle 1 angegeben.

Die durchgeführten Simulationen beginnen immer mit einer T-Zelle, die sich im Gleichgewichtszustand befindet, welcher durch die Gleichungen (33–36) bestimmt ist. Ausgehend von diesen Anfangsbedingungen werden die entsprechenden Stimulationsprotokolle angewendet, die im Ergebnisteil dargestellt sind.

| Parameter | Bedeutung | Wert | QI (%) | Referenz |
|--|--|-------------------------|--------|-----------------------------|
| T-Zell-Geometrie | | | | |
| R_{cell} | Radius der T-Zelle | 8 μM | 4,0 | Bautista et al., 2002 |
| f_R | Anteil Zellkernradius an R_{cell} | 0,25 | 0,1 | Kono et al., 2013 |
| f_V | Volumenverhältnis V_{ER} zu V_{cell} | 0,01 | 2,8 | Bergling et al., 1998 |
| f_A | Faktor für ER-Faltung | 30 | 3,5 | Bergling et al., 1998 |
| C_m | Membran-Kapazität | 28 fF/ μm^2 | 0,0 | Gentet et al., 2000 |
| T | Temperatur | 310 K | - | - |
| Calcium-Konzentrationen im Ruhezustand | | | | |
| C_0 | Ca^{2+} -Ruhekonzentration Zytosol | 0,1 μM | - | Bautista et al., 2002 |
| $C_{ER,0}$ | Ca^{2+} -Ruhekonzentration ER | 0,4 mM | 4,0 | Feske, 2007 |
| C_{ext} | Extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration | 2 mM | 0,0 | Bautista et al., 2002 |
| Membranpotential | | | | |
| V_0 | Ruhepotential Plasmamembran | 60 mV | - | Ishida u. Chused 1993 |
| $V_{ER,0}$ | Ruhepotential ER-Membran | 60 mV | - | Taylor u. Dale, 2012 |
| ΔV_C | Korrekturwert Umkehrpotential | 78 mV | 0,3 | Prakriya u. Lewis, 2002 |
| $\Delta V_{C,ER}$ | Korrekturwert ER-Umkehrpotential | 63 mV | 176 | Variable |
| Calmodulin | | | | |
| b_0 | Calmodulin-Konzentration Zytosol | 100 μM | 3,6 | Persechini u. Cronk, 1999 |
| K_b | Dissoziationskonstante Zytosol | 0,1 μM | 0,2 | Mogami et al., 1999 |
| $b_{ER,0}$ | Calreticulin-Konzentration ER | 30 mM | 4,3 | Mogami et al., 1999 |
| $K_{ER,b}$ | Dissoziationskonstante ER | 0,1 mM | 1,2 | Baksh u. Michalak, 1991 |
| „Second Messenger“ IP_3 | | | | |
| P_0 | Gleichgewichtskonzentration IP_3 | 8,7 nM | 318 | Variable |
| β_P | IP_3 -Produktionsrate | 0,6 nM/s | 6,5 | Variable |
| γ_P | IP_3 -Degradation | 0,01149/s | - | Aus „steady state“ Gl.(35) |
| C_P | Ca^{2+} -Konz. halbmax. IP_3 -Produktion | 0,5 μM | 19,4 | Fridlyand et al., 2003 |
| n_P | Hill-Koeffizient IP_3 -Produktion | 1 | 21,2 | Fridlyand et al., 2003 |
| Dichten der Transmembranproteine | | | | |
| ρ_{IP3R} | Dichte IP_3R in ER-Membran | 11,35/ μm^2 | - | Aus „steady state“ Gl.(34) |
| ρ_{SERCA} | Dichte SERCA in ER-Membran | 700/ μm^2 | 3,7 | Variable |
| ρ_{PMCA} | Dichte PMCA in Plasmamembran | 68,57/ μm^2 | - | Aus „steady state“ Gl.(33) |
| $\rho_{CRAC,0}$ | Ruhewert der Dichte aktiver CRAC | 0,6/ μm^2 | 1,0 | Variable |
| ρ^+_{CRAC} | Maximale Dichte aktiver CRAC | 3,9/ μm^2 | 6,5 | Variable, Luik et al., 2008 |
| ρ^-_{CRAC} | Minimale Dichte aktiver CRAC | 0,5115/ μm^2 | - | Aus „steady state“ Gl.(36) |

Tab. 1: Darstellung der Parameter mit Werten und Referenzen

Die mit Literaturangaben versehenen Parameter entstammen experimentellen Messungen oder resultieren aus den entsprechenden Berechnungen. Die *Variablen* sind mittels eines Algorithmus angepasst (vgl. Kapitel III, 2.8). QI wird in Prozent angegeben und bezieht sich auf die Veränderung, die aus der Erhöhung eines jeden Parameters um 10% resultiert. QI-Werte unter 0,05% werden mit 0,0% angegeben.

IV ERGEBNISSE

1 Biphasisches Calciumsignal im Modell

Die einzelnen Modellteile, welche die jeweiligen Transmembranproteine charakterisieren, werden zu einem Modell kombiniert, um die Calciumdynamik in T-Lymphozyten zu simulieren. Dabei werden experimentelle Gegebenheiten, darunter die Ergebnisse der Veröffentlichung von Bautista et al., repräsentiert (Bautista et al., 2002). Anhand der Simulationen können Analysen der Calciumdynamik durchgeführt werden und darüber hinausgehende Prognosen erfolgen.

1.1 Stimulation des T-Zell-Rezeptors bei extrazellulärem Calcium

Eine Aktivierung der T-Zelle durch Stimulation des T-Zell-Rezeptors führt zu einem intrazellulären Anstieg des „second messengers“ IP_3 , wodurch der IP_3R aktiviert wird und Calcium aus dem ER ausströmt. Es kommt zu einem positiven Feedback-Mechanismus durch den CICR, und der Calciumausstrom aus dem ER wird verstärkt. Dadurch wird die Calciumkonzentration im ER weiter gesenkt. In Abhängigkeit davon wird der CRAC aktiviert, es kommt zum SOCE. Im Zytosol entsteht das charakteristische biphasische Calciumsignal mit dem initialen „Calciumkonzentrations-Peak“ (im Folgenden „Calciumpeak“ genannt) und der sich anschließenden Plateauphase (Bautista et al., 2002; Quintana et al., 2006).

Durch Ausströmen des zytosolischen Calciums durch die PMCA wird das Calciumsignal beendet. Das ER wird durch die SERCA wieder mit Calcium aufgefüllt.

Mit dem Calciumdynamik-Modell der T-Zelle können die experimentellen Befunde zum Calciumsignal (Bautista et al., 2002; Quintana et al., 2006) untersucht werden. In den Experimenten von Bautista et al. und Quintana et al. werden jeweils Jurkat-T-Zellen verwendet, die mit dem monoklonalen Antikörper OKT3 oder mit dem SERCA-Blocker Thapsigargin aktiviert werden. Bei OKT3 handelt es sich um das Immunsuppressivum Muromonab, das an den CD3-Co-Rezeptor des T-Zell-Rezeptors bindet (Abramowicz et al., 1989). Zur Beobachtung der Calciumdynamik unter dem Fluoreszenz-Mikroskop wird der Calciumfarbstoff Fura-2 oder Indo-1 verwendet (Bautista et al., 2002; Quintana et al., 2006).

1.1.1 IP₃R-Eigenschaften beeinflussen biphasisches Calciumsignal

Die Abbildung 1A in der Veröffentlichung von Bautista et al. zeigt eine Jurkat-T-Zelle, die aus dem ruhenden Zustand heraus mit OKT3 stimuliert wird (Abb. 1A in Bautista et al., 2002; siehe Anhang). Die Jurkat-T-Zelle befindet sich dabei in einer Ringerlösung, die 2 mM Calcium enthält. Die Stimulation mit OKT3 führt innerhalb von 100 s zu einem deutlichen Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration auf 1,17 μ M. Nach diesem Calciumpeak kommt es während der folgenden 200 s zu einer Plateauphase bei einer Calciumkonzentration von 0,8 μ M. Diese Calciumdynamik kann mit dem Modell repräsentiert werden (Abb. 7A, Referenz), wobei der Calciumpeak dem Experiment der Abbildung 1A in Bautista et al. entspricht (Abb. 7A, schwarze Dreiecke). Ausgehend von einer Calciumkonzentration von 0,1 μ M, wird in der Simulation innerhalb von 80 s ein Calciumpeak mit der Amplitude 1,23 μ M erreicht (Abb. 7A, schwarze Linie). Anschließend etabliert sich die Plateauphase mit einem finalen Niveau bei 0,75 μ M.

Abbildung 1A aus Bautista et al. wird zur Bestimmung der unbekannten Modellparameter verwendet (siehe Tab. 1 in Kapitel III, 2.8) (Bautista et al., 2002). Die Höhe des Calciumpeaks ist dabei sowohl von der Aktivierung des IP₃R als auch von der des CRAC abhängig. Die Wahl der Gleichgewichtskonzentration von IP₃ (Variable P_0) ist entscheidend für eine korrekte Aktivierung des IP₃R. Mit einer Gleichgewichtskonzentration von $P_0 = 8,7$ nM sind optimale Ergebnisse erzielbar. Zur korrekten Generierung der Plateauphase des biphasischen Calciumsignals ist die „maximale CRAC-Dichte“, die mit der Variablen ρ^+_{CRAC} die maximal aktivierbare Anzahl an CRAC darstellt, von Bedeutung. Mit einem Faktor von $f_{\text{CRAC}} = 6,5$ (siehe Gleichung (26)) kann dem Experiment aus Abbildung 1A in Bautista et al. am besten entsprochen werden (Bautista et al., 2002).

Bautista et al. gehen davon aus, dass eine verzögerte Aktivierung der PMCA indirekt für den deutlichen initialen Anstieg der Calciumkonzentration, den sogenannten Calciumpeak, verantwortlich ist (Bautista et al., 2002). Diese Annahme wird *in silico* mit dem Calciumdynamik-Modell untersucht. Dazu wird der Parameter τ_{PMCA} , der für die zeitliche Verzögerung bis zum Eintreten der Aktivierung steht, von zunächst 50 s (Caride et al., 2001a) auf 1 ms reduziert. Die anderen Simulationsbedingungen bleiben unverändert. Die Modifizierung des Parameters τ_{PMCA} hat keine Veränderungen der Konfiguration des Gleichgewichtszustands („steady state“) zur Folge, daher können alle anderen Parameter beibehalten werden. Unter diesen Bedingungen wird im Modell weiterhin ein Calciumpeak beobachtet, allerdings mit einer geringeren Amplitude (Abb. 7A, blaue Linie). Im Vergleich zur *in silico*-Referenz mit einem Amplitudenwert von

1,23 μM , wird jetzt nur noch eine maximale Calciumkonzentration von 0,98 μM erreicht. Die Höhe des Plateaus sowie die Zeitspanne zwischen Peak und Plateau ist unverändert. Das Ergebnis der Simulation unterstützt zwar die Annahme von Bautista et al. hinsichtlich eines Einflusses der PMCA bei der Generierung des Peaks (Bautista et al., 2002), allerdings kann das Modell zeigen, dass die zeitliche Verzögerung der Aktivierung der PMCA nicht essentiell für die Existenz des Peaks ist. Dieses Ergebnis wirft die Frage auf, ob ein anderer Parameter im Modell, der sich auf die zeitliche Verzögerung der Aktivierung eines Kanals oder einer Pumpe bezieht, für den Calciumpeak verantwortlich ist.

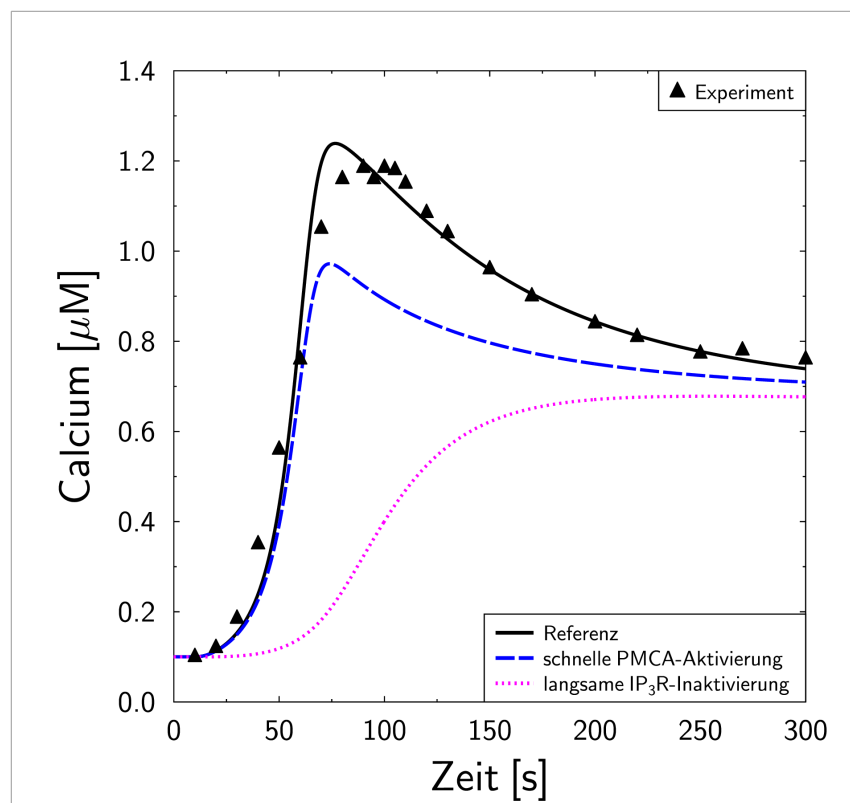


Abb. 7A: Calciumdynamik im Modell

Simulation des Experiments aus Abb. 1A in Bautista et al., 2002. Die T-Zelle im Gleichgewichtszustand wird zum Zeitpunkt $t = 10$ s stimuliert, indem in Gleichung (7) $T(t) = 1,6$ gesetzt wird. Die Stimulation wird während der gesamten Simulation aufrechterhalten.

Die Referenz (schwarze Linie) ist die Simulation, die als Basis für alle Simulationen dient und die mit den experimentellen Ergebnissen verglichen wird (schwarze Dreiecke). Zur Simulation der schnellen Aktivierung der PMCA wird in Gleichung (31) $\tau_{PMCA} = 1$ ms verwendet. Für die Simulation der langsamen IP_3R -Inaktivierung wird in Gleichung (29) $\theta_{\text{IP}_3\text{R}} = 300$ s gesetzt.

Es werden alle Verzögerungsparameter des Modells getestet. Dabei kann für den Parameter θ_{IP_3R} , der sich auf die zeitliche Verzögerung bis zum Einsetzen der Inaktivierung bezieht, ein Einfluss auf die Existenz des Calciumpeaks nachgewiesen werden (Abb. 7A, rosafarbene Linie). Ein Calciumpeak wird dabei in der Simulation nicht erreicht, es kommt lediglich zu einem flachen Anstieg der Calciumkonzentration im Bereich von 100–150 s auf 0,68 μM .

Die Simulationen mit dem Modell legen nahe, dass Eigenschaften des IP_3R für den Calciumpeak nach einer Stimulation des T-Zell-Rezeptors verantwortlich sind. Dies steht im Gegensatz zur Aussage in Bautista et al., wonach das verzögerte Einsetzen der PMCA-Aktivierung den Peak verursacht (Bautista et al., 2002).

1.1.2 Analyse der Calciumströme mit dem Modell

Mit dem Modell kann analysiert werden, in welchem Ausmaß die Kanäle und Pumpen der T-Zelle mit ihren jeweiligen Calciumströmen an den verschiedenen Phasen der Calciumdynamik beteiligt sind (Abb. 7B). Dabei bezieht sich die Analyse der Calciumströme auf die Simulation, die dem Experiment entspricht (Abb. 7A, schwarze Linie).

Der gesamte Calciumstrom vom ER ins Zytosol durch die IP_3R (Abb. 7B, rosafarbene Linie) liegt bei einem Wert von -2,5 pA und besteht auch noch über die Zeitspanne des Calciumpeaks hinaus. Dies liegt daran, dass die IP_3R den „Gegenstrom“ zum Calciumeinstrom durch die SERCA generieren. Für die SERCA (Abb. 7B, orangene Linie) kann demnach ein deutlicher Strom der Calciumionen aus dem Zytosol in das ER von insgesamt 2,45 pA festgestellt werden. Durch die erhöhte Calciumkonzentration im Zytosol werden mit leichter Verzögerung die PMCA in der Plasmamembran aktiviert und ein Netto-Calciumausstrom von maximal 0,5 pA verlässt die Zelle (Abb. 7B, schwarze gestrichelte Linie). Der Calciumstrom, der maximal mit -0,5 pA durch alle CRAC in das Zytosol einströmt (Abb. 7B, violette Linie), wird durch die Abnahme der Calciumkonzentration im ER induziert. Der Calciumeinstrom durch die CRAC verhält sich dabei nicht so, dass eine Hauptbeteiligung der CRAC am Calciumpeak wahrscheinlich erscheint: Im Gegensatz zum raschen, deutlich ausgeprägten Calciumeinstrom ins Zytosol durch die IP_3R , zeigt der Calciumeinstrom durch die CRAC nur eine sehr langsame Dynamik und eine geringe Amplitude (Abb. 7B, violette Linie).

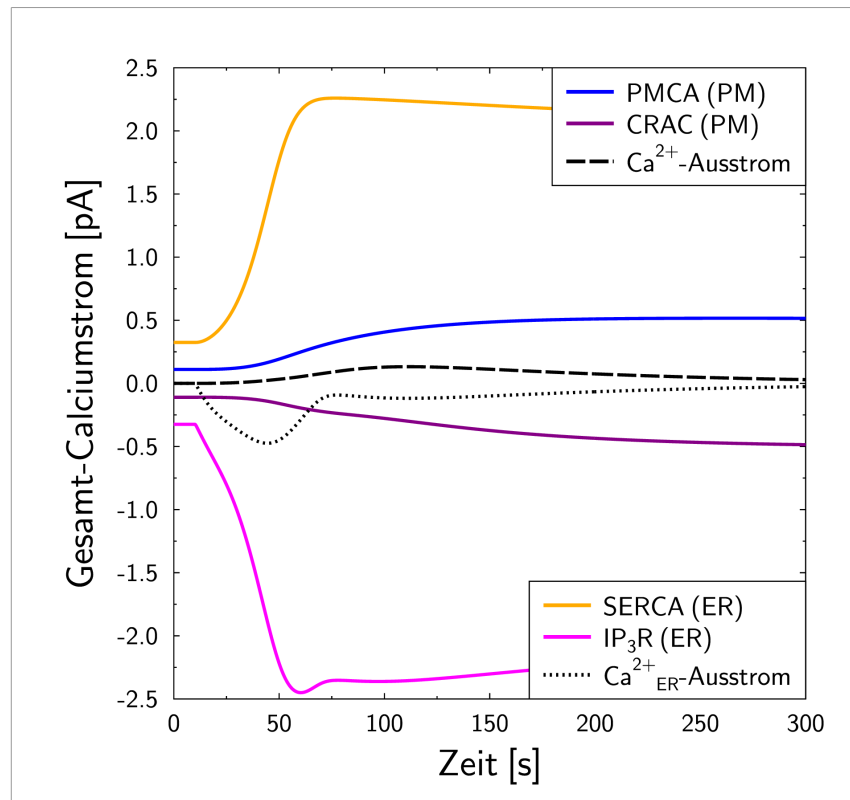


Abb. 7B: Calciumströme im Modell

Simulation des Experiments aus Abb. 1A in Bautista et al., 2002. Die T-Zelle im Gleichgewichtszustand wird zum Zeitpunkt $t = 10$ s stimuliert, indem in Gleichung (7) $T(t) = 1,6$ gesetzt wird. Die Stimulation wird während der gesamten Simulation aufrechterhalten. Der Gesamt-Calciumstrom ist für alle jeweiligen Kanäle und Pumpen angegeben. Positive Calciumströme bewirken einen Ausstrom von Calcium aus dem Zytosol (PMCA und SERCA). Negative Calciumströme verursachen einen Einstrom von Calcium in das Zytosol (CRAC und IP₃R). Es wird die initiale Calciumfreisetzung aus dem ER durch die IP₃R gezeigt, gefolgt von einem Calciumeinstrom in das Zytosol durch die CRAC.

Aufgrund der Gegenreaktion durch die PMCA können die CRAC in der Summe keinen Netto-Calciumeinstrom in das Zytosol bewirken, sondern sie dienen der Aufrechterhaltung des Calciumsignals. Die T-Zelle wird somit durch die CRAC vor einem Verlust an Calcium während der Aktivierungszeit bewahrt.

Das Ergebnis dieser Simulation zeigt, dass der CRAC bei der Generierung des Calciumpeaks eine untergeordnete Rolle spielt. Den Hauptanteil an der Entstehung des Peaks trägt der CICR durch den IP₃R. Die Aufgabe des CRAC besteht hingegen vorwiegend in der Stabilisierung des Calciumsignals und der Aufrechterhaltung der T-Zell-Aktivierung. Diese Verhältnisse werden durch die Analyse der Einzelkanal-Calciumströme im Modell belegt (Abb. 7C).

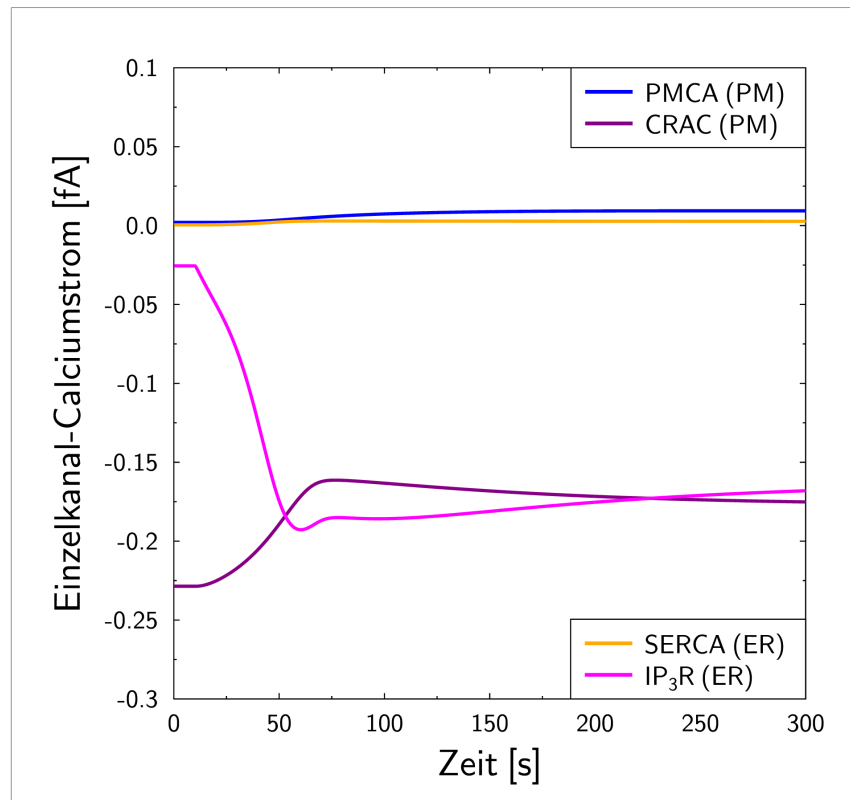


Abb. 7C: Calciumströme durch einzelne Kanäle im Modell

Simulation des Experiments aus Abb. 1A in Bautista et al., 2002. Die T-Zelle im Gleichgewichtszustand wird zum Zeitpunkt $t = 10$ s stimuliert, indem in Gleichung (7) $T(t) = 1,6$ gesetzt wird. Die Stimulation wird während der gesamten Simulation aufrechterhalten.

Durch den IP₃R fließt ein deutlicher Calciumstrom aus dem ER in das Zytosol (CICR). Die Stärke des Calciumstroms durch den CRAC vermindert sich im Vergleich zur unstimulierten T-Zelle ($t < 10$ s). Es sind folglich nicht die Einzelkanal-Charakteristika, welche die Erhöhung des Gesamt-Calciumstroms in das Zytosol durch die CRAC verursachen (vgl. Abb. 7B).

Der Calciumstrom durch einen einzelnen IP₃R (Abb. 7C, rosafarbene Linie) reagiert mit einem ausgeprägten Calciumstrom von -0,2 fA aus dem ER in das Zytosol deutlich und direkt auf die Stimulation des T-Zell-Rezeptors. Der einzelne CRAC reagiert auf die Leerung des ER mit einer Verringerung des Einstroms extrazellulären Calciums in das Zytosol von -0,225 fA auf -0,175 fA (Abb. 7C, violette Linie), da der CRAC durch die Rückkopplung aufgrund der Erhöhung des zytosolischen Calciums eine Inaktivierung erfährt (Zweifach und Lewis, 1995a). Die einzelnen Calciumströme durch die Pumpen SERCA und PMCA fallen sehr gering aus und liegen bei 0,003 fA für die SERCA (Abb. 7C, orangene Linie) beziehungsweise bei 0,01 fA für die PMCA (Abb. 7C, blaue Linie). Dies entspricht den maximalen Calciumstromwerten, die die Pumpen im Experiment erreichen können (Juhaszova et al., 2000).

1.1.3 Dichte der CRAC ist entscheidend für Calciumsignal

Die Reduktion der Calciumkonzentration im ER führt zu einem Anstieg der Dichte der aktiven CRAC (Abb. 7D). Somit ist der Gesamt-Calciumeinstrom durch die CRAC in das Zytosol der T-Zelle (Abb. 7B, violette Linie) nicht die Folge einer verstärkten Aktivierung der einzelnen Kanäle (Abb. 7C, violette Linie), sondern resultiert aus der Zunahme der Dichte der CRAC (Abb. 7D).

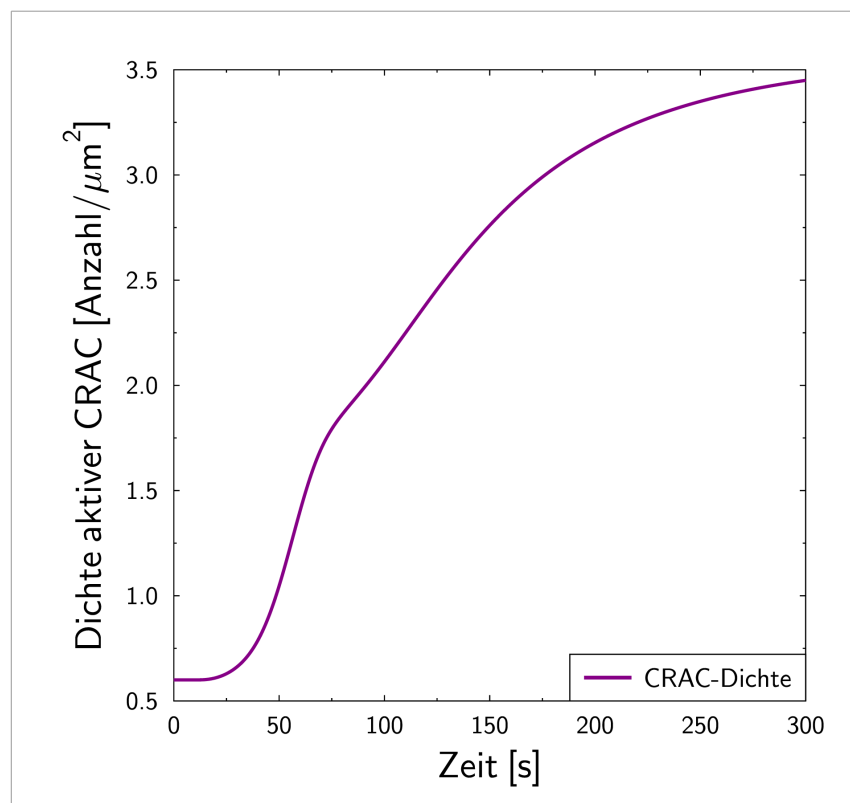


Abb. 7D: CRAC-Dichte im Modell

Simulation des Experiments aus Abb. 1A in Bautista et al., 2002. Die T-Zelle im Gleichgewichtszustand wird zum Zeitpunkt $t = 10$ s stimuliert, indem in Gleichung (7) $T(t) = 1,6$ gesetzt wird. Die Stimulation wird während der gesamten Simulation aufrechterhalten.

Die Dichte der aktiven CRAC reagiert dynamisch und nimmt in Folge der Stimulation um das 5,7-fache zu. Dies begründet die Zunahme des Gesamt-Calciumstroms durch die CRAC (vgl. Abb. 7B).

Die Dichtezunahme der CRAC ist für die Aufrechterhaltung des zytosolischen Calciumsignals entscheidend.

Bedingt durch die Senkung der Calciumkonzentration im ER aufgrund der Stimulation des T-Zell-Rezeptors, nimmt die Dichte der CRAC dabei ausgehend von 0,6 Kanälen pro μm^2 kontinuierlich um das 5,7-fache auf einen Wert von 3,4 Kanälen pro μm^2 zu (Abb. 7D). Dadurch kann vermehrt extrazelluläres Calcium einströmen.

1.2 Stimulation der T-Zelle in calciumfreier Umgebung

Experimente, die unter calciumfreien Bedingungen durchgeführt werden, haben die Untersuchung der ER-Calciumströme in Folge einer Stimulation des T-Zell-Rezeptors zum Ziel. Die Jurkat-T-Zelle befindet sich dabei in einer calciumfreien Ringerlösung, um einen Calciumeinstrom durch den CRAC zu verhindern (Bautista et al., 2002). Die Stimulation des T-Zell-Rezeptors bewirkt einen zytosolischen Calciumpeak bei 120 s (erste Graphik der Abb. 2A in Bautista et al., 2002; siehe Anhang). Innerhalb von 200 s wird die zytosolische Calciumkonzentration auf einen Wert gesenkt, der leicht unterhalb des Ausgangsniveaus liegt. Im Vergleich zum vorangegangenen Experiment mit extrazellulärem Calcium ist die Amplitude des Peaks geringer, sie beträgt statt 1,17 μM (Abb. 1A in Bautista et al., 2002) nur 0,5 μM (Abb. 2A in Bautista et al., 2002).

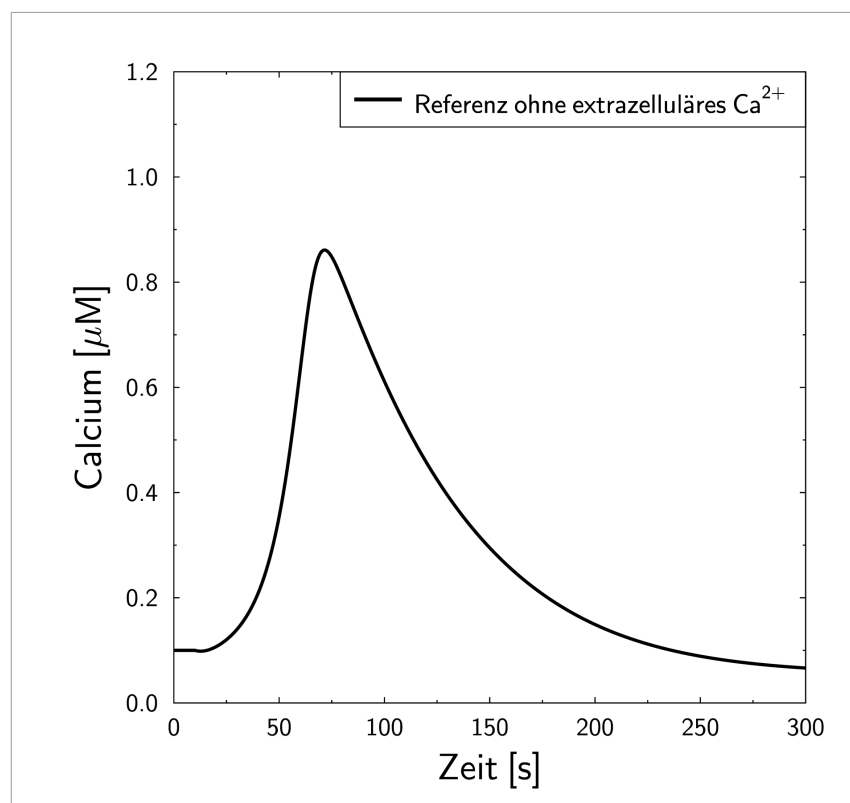


Abb. 8A: Calciumdynamik ohne extrazelluläres Calcium im Modell

Simulation des Experiments aus Abb. 2A in Bautista et al., 2002. Die T-Zelle im Gleichgewichtszustand wird zum Zeitpunkt $t = 10$ s stimuliert, indem in Gleichung (7) $T(t) = 1,6$ gesetzt wird. Gleichzeitig wird die extrazelluläre Calciumkonzentration auf Gleichung C^* (38) gesetzt.

Die Amplitude des „Calciumpeaks“ ist in Abwesenheit extrazellulären Calciums relativ gering (vgl. Abb. 7A). Der Anstieg der Calciumkonzentration resultiert aus der Leerung des ER-Calciumspeichers. Der Anteil, der hier die Differenz zum Peak in Abb. 7A ausmacht, kann auf den Beitrag der CRAC zurückgeführt werden.

Im Modell kann aufgrund der Nernst-Gleichung das extrazelluläre Calcium nicht auf Null gesetzt werden. Dies liegt daran, dass die Nernst-Gleichung unter sehr niedrigen Calciumbedingungen ihre Gültigkeit verliert und das Umkehrpotential divergiert. Im Modell wird das extrazelluläre Calcium daher auf die Konzentration C^* gesetzt. Im „steady state“ verschwindet bei diesem Wert der Calciumeinstrom durch den CRAC, denn die extrazelluläre und die zytosolische Calciumkonzentration werden gleichgesetzt.

$$C_{\text{ext}}^* = C_0 \exp \left\{ \frac{(V_0 - \Delta V_C) z_{\text{Ca}} F}{RT} \right\} \quad (38)$$

Damit kann der experimentellen Situation im Modell entsprochen werden (Abb. 8A). Der Calciumeinstrom durch den CRAC geht gegen Null (Abb. 8B, violette Linie).

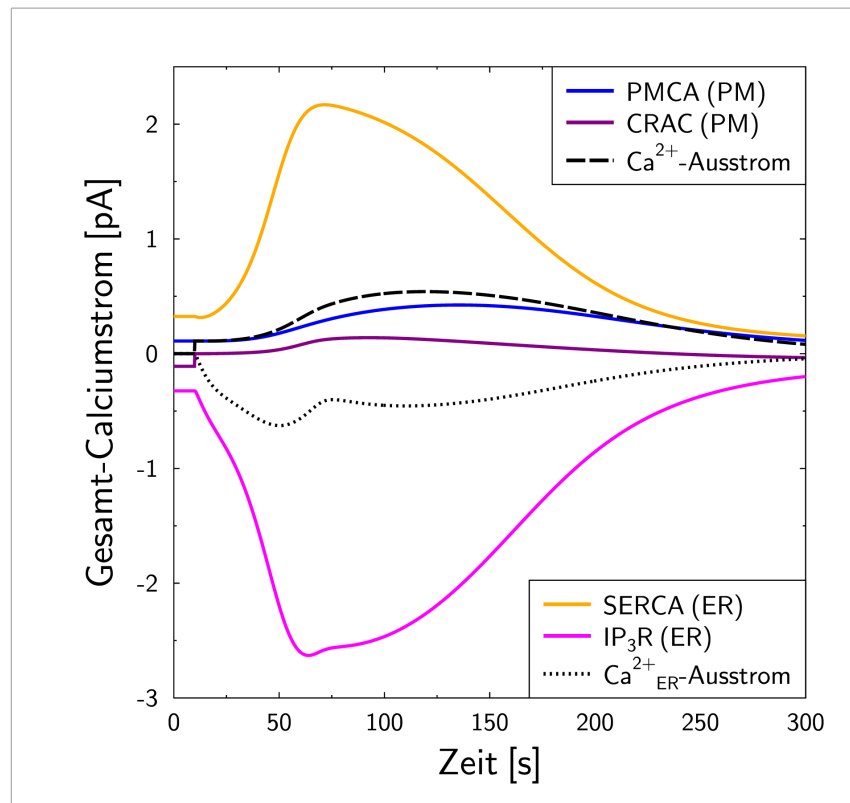


Abb. 8B: Calciumströme ohne extrazelluläres Calcium im Modell

Simulation des Experiments aus Abb. 2A in Bautista et al., 2002. Die T-Zelle im Gleichgewichtszustand wird zum Zeitpunkt $t = 10$ s stimuliert, indem in Gleichung (7) $T(t) = 1,6$ gesetzt wird. Gleichzeitig wird die extrazelluläre Calciumkonzentration auf Gleichung C^* (38) gesetzt.

Der Gesamt-Calciumstrom ist für alle jeweiligen Kanäle und Pumpen angegeben. Der Calciumstrom durch die CRAC wird aufgrund der Verwendung von Gleichung (38) nahezu vollständig inhibiert. Der zytosolische Calciumpeak (vgl. Abb. 8A) wird in diesem Fall ausschließlich durch den IP_3R -Calciumstrom aus dem ER in das Zytosol verursacht.

Der Calciumpeak in Abbildung 8A ist mit einer Amplitude von knapp $0,87 \mu\text{M}$ etwas niedriger als der Calciumpeak, der in der Referenzsimulation bei einer normalen extrazellulären Calciumkonzentration beobachtbar ist (Abb. 7A, Referenz). Diese Relation stimmt mit den experimentellen Resultaten überein (Bautista et al., 2002). Allerdings ist der Calciumpeak in der Simulation um $0,37 \mu\text{M}$ (Abb. 8A) größer als im Experiment, wobei er hier $0,5 \mu\text{M}$ beträgt (Abb. 2A in Bautista et al., 2002). Die zeitlichen Verhältnisse sowohl des Anstiegs der Calciumkonzentration als auch dessen Senkung sind in Simulation und Experiment konsistent. Dabei wird ebenso die über das Ausgangsniveau hinausgehende Absenkung der zytosolischen Calciumkonzentration mit dem Abklingen der Aktivierung reproduziert (Abb. 8A).

Da der Calciumeinstrom durch den CRAC während der gesamten Simulationszeit fast gegen Null geht (Abb. 8B, violette Linie), erscheint die Verwendung von C^* geeignet, um die Bedingungen im Experiment von Bautista et al. zu reproduzieren (Abb. 2 in Bautista et al., 2002).

1.2.1 Leerung des ER-Calciumspeichers verursacht Calciumpeak

Thapsigargin (TG) wird häufig in Experimenten verwendet, um die SERCA in der ER-Membran zu blockieren (Hess et al., 1993; Quintana et al., 2006). Dadurch wird die Calciumaufnahme durch das ER verhindert und die Calciumkonzentration im ER-Lumen wird kontinuierlich gesenkt. Auf diese Weise kann die Calciumkonzentration, die aus dem ER in das Zytosol strömt, erfasst werden. Dabei muss allerdings bedacht werden, dass die PMCA das Calcium folglich verstärkt aus der Zelle transportiert. Die Absenkung des ER-Calciumgehalts würde einen Calciumeinstrom durch die CRAC bedingen (Bergling et al., 1998; Bautista et al., 2002; Bautista et al., 2004; Quintana et al., 2006). Um dies zu vermeiden, wird das Experiment, das der Simulation zugrunde liegt, mit Jurkat-T-Zellen in einer calciumfreien Ringerlösung durchgeführt (Abb. 1A in Quintana et al., 2006; siehe Anhang). Nach der Thapsigargin-Zugabe kommt es nach 100 s zu einem niedrigen Calciumpeak mit einer Amplitude von $0,5 \mu\text{M}$. Anschließend wird die Calciumkonzentration langsam wieder abgesenkt und erreicht nach 550 s einen Wert unterhalb des Ausgangsniveaus (Quintana et al., 2006).

Die experimentellen Bedingungen des ersten Teils der Abbildung 1A in Quintana et al. werden *in silico* nachgestellt. Einerseits kann dadurch der Anteil des ER-Calciums erfasst werden, andererseits kann anhand des Modells gezeigt werden, dass durch die Leerung

des ER-Calciumspeichers der CRAC rekrutiert wird und die Dichte der CRAC in der Plasmamembran zunimmt. Es wird Gleichung (38) zur Absenkung des extrazellulären Calciumgehalts auf nahezu Null verwendet. Die SERCA-Blockierung wird im Modell durch Ausschalten des SERCA-Calciumstroms erzielt, indem die Gleichung (32) auf $I_{\text{SERCA}} = 0$ zum Zeitpunkt $t = 10$ s gesetzt wird. Eine zusätzliche Stimulation des T-Zell-Rezeptors erfolgt nicht. Die Calciumdynamik, die aus der Simulation resultiert, kann die experimentellen Verhältnisse, wie sie in Quintana et al. gegeben sind, repräsentieren (Abb. 9A, schwarze Linie) (erster Graphikteil der Abb. 1A in Quintana et al., 2006).

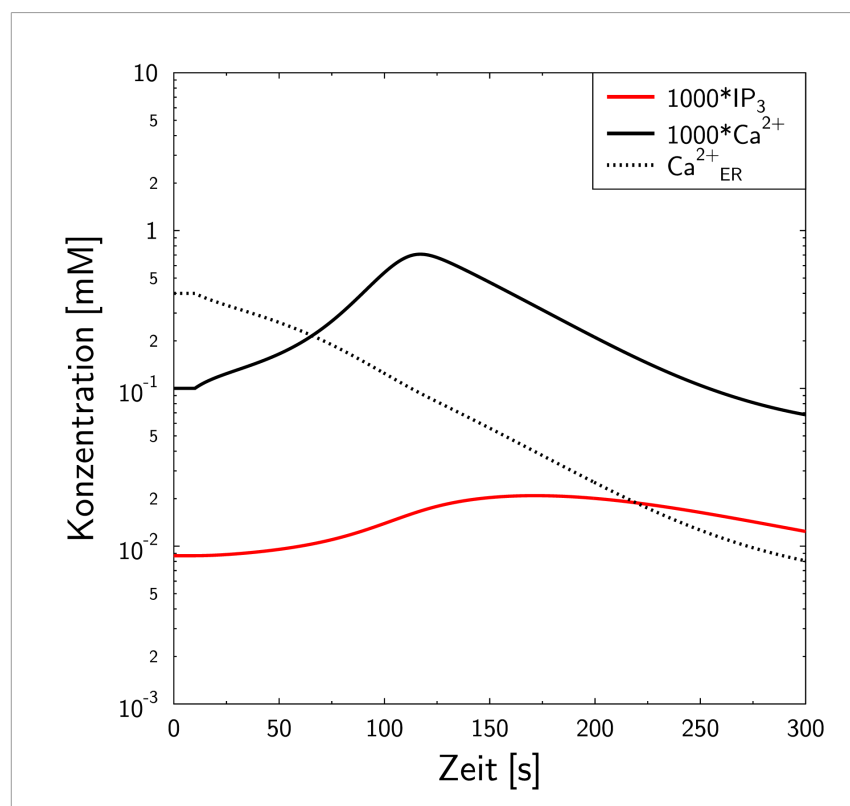


Abb. 9A: Calciumdynamik unter Blockierung der SERCA im Modell

Simulation des Experiments aus Abb. 1A in Quintana et al., 2006. Die T-Zelle befindet sich zunächst im Gleichgewichtszustand. Ab dem Zeitpunkt $t = 10$ s wird für die extrazelluläre Calciumkonzentration Gleichung C^* (38) verwendet und der Calciumstrom durch die SERCA in Gleichung (32) wird auf Null gesetzt, um die Blockierung durch Thapsigargin zu simulieren. Die gezeigten IP_3 - und Ca^{2+} -Konzentrationen sind hier um den Faktor 1000 verstärkt.

Das ER setzt Calcium frei und die Calciumkonzentration im Zytosol steigt an. Die IP_3 -Konzentration erhöht sich zunächst und ist dann rückläufig.

Es ist in Abbildung 9A zu sehen, dass die Aktivierung mit Thapsigargin zum Zeitpunkt $t = 10$ s zu einem langsamen Anstieg der Calciumkonzentration im Zytosol, ausgehend von $0,1 \mu\text{M}$, führt. Zur besseren Darstellung entspricht die gezeigte Calciumdynamik, die in Abbildung 9A (schwarze Linie) in mM angegeben ist, der 1000-fachen Calciumkonzentration. Bei 110 s wird ein Calciumpeak mit einer Amplitude von $0,8 \mu\text{M}$ ($0,8 \text{ mM}/1000$) erreicht. Der Calciumpeak der Simulation liegt damit etwas über dem Amplitudenwert von $0,5 \mu\text{M}$ im Experiment (Abb. 1A in Quintana et al., 2006). Der Peak in der Simulation flacht dann langsam ab und erreicht mit einer Calciumkonzentration von $0,07 \mu\text{M}$ einen Wert, der sich unterhalb des Ausgangsniveaus von $0,1 \mu\text{M}$ befindet. Die Abbildung 9A zeigt, dass eine kontinuierliche Leerung des ER-Calciumspeichers aufgrund der blockierten SERCA erfolgt (Abb. 9A, schwarze, gepunktete Linie). Die Calciumkonzentration im ER sinkt dabei im Verlauf von 300 s von $0,5 \mu\text{M}$ auf $0,0008 \mu\text{M}$.

1.2.2 Leerung des ER-Calciumspeichers bedingt IP_3 -Dynamik

Der Abbildung 9A kann entnommen werden, dass die Konzentration des IP_3 sich in Folge der Calciumdynamik verändert (Abb. 9A, rote Linie). Die Produktion des IP_3 ist im Modell nach Gleichung (7) im Zusammenhang mit der Calciumkonzentration im Zytosol zu sehen (Fridlyand et al., 2003; Meyer-Hermann, 2007). Dies ist damit zu begründen, dass die Phospholipase C, die das IP_3 enzymatisch produziert, von Calcium abhängig ist (Michal, 1999). Dadurch kommt es aufgrund der Zunahme der zytosolischen Calciumkonzentration durch Leerung des ER zu einer IP_3 -Dynamik. Ausgehend von einer IP_3 -Konzentration von $8,7 \text{ nM}$ steigt diese im Bereich des Calciumpeaks bei 100 s langsam an und erreicht einen Maximalwert von 20 nM . Zur besseren Darstellung entspricht die gezeigte IP_3 -Dynamik, die in Abbildung 9A (rote Linie) in mM angegeben ist, der 1000-fachen IP_3 -Konzentration. Nach 210 s sinkt die IP_3 -Konzentration langsam wieder und erreicht in den 300 s des Simulations-Zeitraums nicht wieder den Ausgangswert, sondern liegt im Bereich von 10 nM .

1.2.3 Rekrutierung der CRAC muss nicht zu Calciumeinstrom führen

Die Leerung des ER-Calciumspeichers führt, wie dies bereits in den ersten Simulationen gezeigt werden konnte, zu einem deutlichen Anstieg der Anzahl der CRAC in der Plasmamembran (Abb. 7D und 9B). Diese können aufgrund der calciumfreien Umgebung zwar keinen Calciumeinstrom in das Zytosol leiten, dennoch werden die ORAI-Proteine durch

den ER-Calciumsensor STIM1 rekrutiert und die CRAC werden gebildet. Ausgehend von 0,6 Kanälen pro μm^2 nimmt die Dichte rasch zu und erreicht bereits nach 150 s den maximalen Wert von 3,9 Kanälen pro μm^2 (Abb. 9B). Mit einer raschen Zunahme der Kanaldichte um das 6,5-fache wird in Abbildung 9B im Vergleich zu Abbildung 7D eine stärkere und schnellere Rekrutierung der CRAC in der Plasmamembran erreicht, da die SERCA aufgrund der Blockierung mit Thapsigargin das ER nicht wieder mit Calcium füllen kann.

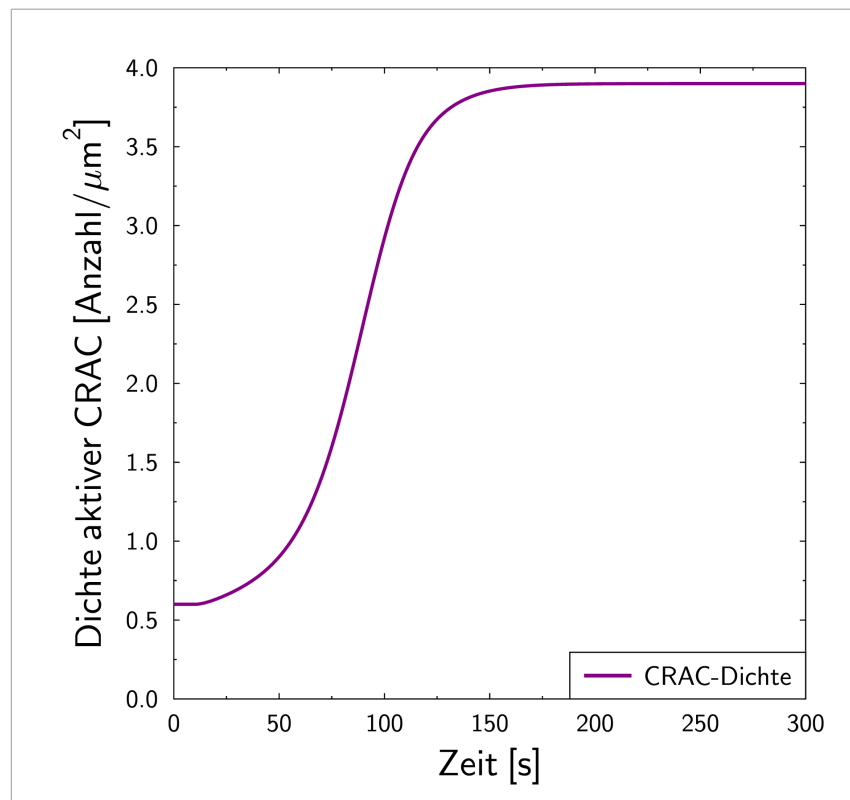


Abb. 9B: CRAC-Dichte unter Blockierung der SERCA im Modell

Simulation des Experiments aus Abb. 1A in Quintana et al., 2006. Die T-Zelle befindet sich zunächst im Gleichgewichtszustand. Ab dem Zeitpunkt $t = 10$ s wird für die extrazelluläre Calciumkonzentration Gleichung C^* (38) verwendet und der Calciumstrom durch die SERCA in Gleichung (32) wird auf Null gesetzt.

Die CRAC-Dichte nimmt aufgrund der kontinuierlichen Leerung des ER-Calciumspeichers bis zum Erreichen der maximalen CRAC-Dichte zu. Da kein extrazelluläres Calcium vorhanden ist, kann durch die rekrutierten CRAC allerdings kein Calciumeinstrom erfolgen.

1.3 PMCA- und SERCA-Blockierung ohne extrazelluläres Calcium

Mit einem Versuchsprotokoll, bei dem die SERCA blockiert ist und das Calcium kontinuierlich aus dem ER strömt, kann der Einfluss der PMCA auf die Absenkung des erhöhten zytosolischen Calciumgehalts im Experiment untersucht werden (Abb. 6C in Bautista et al., 2002; siehe Anhang). Dazu befindet sich die Jurkat-T-Zelle zunächst in calciumfreier Ringerlösung und durch Zugabe von Thapsigargin wird der Calciumspeicher im ER über einen Zeitraum von 500 s geleert. Dadurch wird ein Anstieg der Calciumkonzentration im Zytosol von $0,28 \mu\text{M}$ bewirkt. Zusätzlich werden die Mitochondrien mit Oligomycin und Antimycin inhibiert, um deren Funktion als Calciumspeicher auszuschalten. Nach 530 s wird die Zelle im gleichen Versuch mit einer Ringerlösung, die 2 mM extrazelluläres Calcium enthält, umgeben, so dass die rekrutierten CRAC Calcium in das Zytosol leiten können und einen Calciumpeak von $0,7 \mu\text{M}$ verursachen. Danach wird das extrazelluläre Calcium durch Ersetzen des Mediums mit calciumfreier Ringerlösung entfernt. Der Peak wird durch die PMCA mit einer Zeitkonstante von $\tau = 31 \text{ s}$ wieder auf den Ausgangswert gesenkt. Anschließend wird der Versuch wiederholt, in diesem Experiment jedoch mit Inhibierung der PMCA durch Lanthan (La^{3+}) (Abb. 6C in Bautista et al., 2002). Da La^{3+} zusätzlich den CRAC blockiert (Aussel et al., 1996; Hou et al., 2012), ist davon auszugehen, dass die Darstellung des La^{3+} -Balkens, mit dem in der Abbildung 6C in Bautista et al. die Zeitspanne der La^{3+} -Zugabe angegeben ist, etwas zu weit links beginnt (Abb. 6C in Bautista et al., 2002). Andernfalls könnte aufgrund der mit La^{3+} blockierten CRAC kein extrazelluläres Calcium in das Zytosol einströmen. Aufgrund der La^{3+} -Inhibierung der PMCA ist die Zeitspanne, innerhalb derer der Peak wieder gesenkt wird, deutlich länger als im vorangegangenen Experiment. Statt der vorherigen Zeitkonstante $\tau = 31 \text{ s}$ sind es jetzt $\tau = 480 \text{ s}$, zudem wird die Ausgangs-Calciumkonzentration innerhalb des Experiments nicht mehr erreicht.

In einem zweiten Versuch wird einer Jurkat-T-Zelle, die sich zunächst in calciumfreier Ringerlösung befindet, kontinuierlich der PMCA-Blocker Carboxyeosin zugegeben (Abb. 6D in Bautista et al., 2002; siehe Anhang). Eine Blockierung des CRAC durch Carboxyeosin ist bisher nicht bekannt (Feske, 2007; Parekh, 2010). Im Vergleich zur Kontrolle, die auf die Stimulation mit Thapsigargin mit einem Calciumpeak von $0,2 \mu\text{M}$ reagiert, ist der Anstieg der Calciumkonzentration im Carboxyeosin-Experiment mit $0,5 \mu\text{M}$ deutlich höher. Nach 600 s wird die Zelle im gleichen Versuch mit calciumhaltiger Ringerlösung umgeben, woraus ein Calciumpeak mit einer Amplitude von $1,2 \mu\text{M}$ resultiert. Diese Amplitude wird auch in der Kontrolle fast erreicht (gepunktete Linie in

Abb. 6D in Bautista et al., 2002). In der Kontrolle wird die Calciumkonzentration jedoch anschließend mit einer Zeitkonstante $\tau = 28$ s gesenkt, im Carboxyeosin-Experiment mit blockierter PMCA sind es hingegen $\tau = 75$ s (Abb. 6D in Bautista et al., 2002).

1.3.1 Analyse der beteiligten Transmembranproteine am Calciumausstrom

Bautista et al. gehen davon aus, dass die PMCA die entscheidende Pumpe darstellt, die für die Senkung der erhöhten Calciumspiegel verantwortlich ist (Bautista et al., 2002). Es wird ein entsprechendes Versuchsprotokoll im Modell angewendet, um festzustellen, ob ausschließlich die PMCA die Absenkung der zytosolischen Calciumkonzentration bedingt oder ob andere Mechanismen relevant sind (Abb. 10).

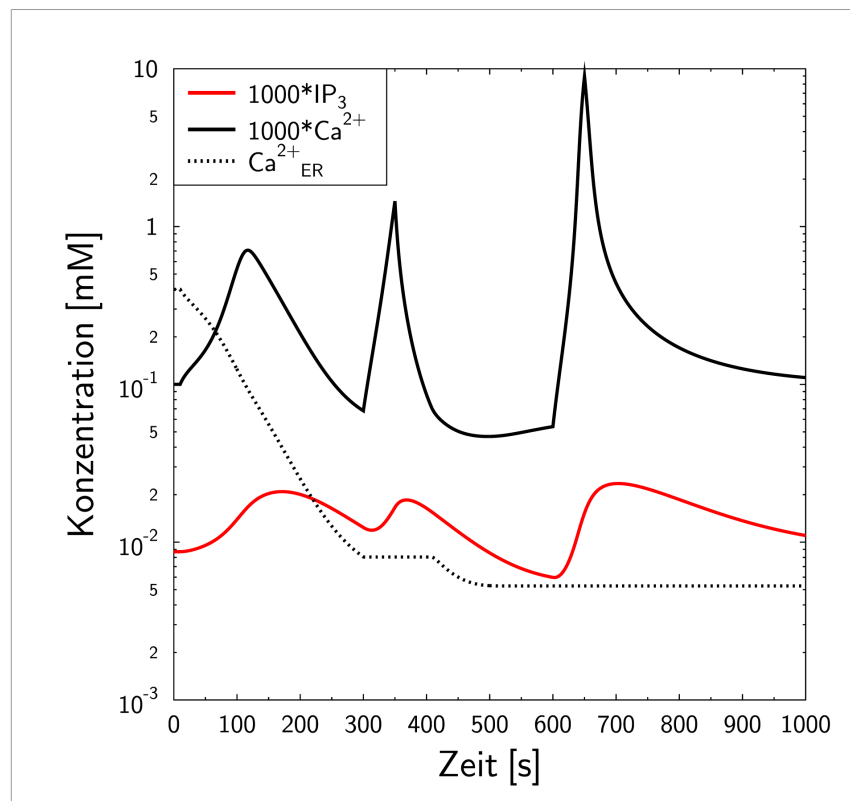


Abb. 10A: Calciumdynamik unter PMCA- und SERCA-Blockierung im Modell

Simulation des Experiments aus Abb. 6C in Bautista et al., 2002. Die T-Zelle befindet sich zunächst im Gleichgewichtszustand. Ab dem Zeitpunkt $t = 10$ s wird für die extrazelluläre Calciumkonzentration Gleichung (38) verwendet und der Calciumstrom durch die SERCA in Gleichung (32) wird auf Null gesetzt. Zum Zeitpunkt $t = 300$ s und zum Zeitpunkt $t = 600$ s wird die extrazelluläre Calciumkonzentration für 50 s auf Normalniveau gesetzt. Anschließend wird jeweils erneut zu Gleichung (38) gewechselt. Zum Zeitpunkt $t = 600$ s wird zudem der Calciumstrom durch die PMCA in Gleichung (30) auf Null gesetzt.

Wird im Modell eine parallele PMCA- und CRAC-Blockierung entsprechend des Experiments in Abbildung 6C in Bautista et al. mit La^{3+} durchgeführt, so kann bei gleichzeitiger SERCA-Inhibierung mit Thapsigargin und ohne extrazelluläres Calcium im Anschluss an den Calciumpeak im Modell keine Absenkung der erhöhten Calciumkonzentration stattfinden.

Daher wird die Abbildung 6C in Bautista et al. simuliert, jedoch wird im Modell davon ausgegangen, dass anstelle des La^{3+} ein reiner PMCA-Antagonist (z.B. Carboxyeosin) verwendet wird, der keine Auswirkungen auf den CRAC hat (Abb. 10) (vgl. Abb. 6C in Bautista et al., 2002). Wie in vorangegangenen Simulationen wird der Calciumspeicher im ER geleert (Abb. 10A, schwarze, gepunktete Linie), wodurch die Dichte aktiver CRAC ansteigt (Abb. 10B).

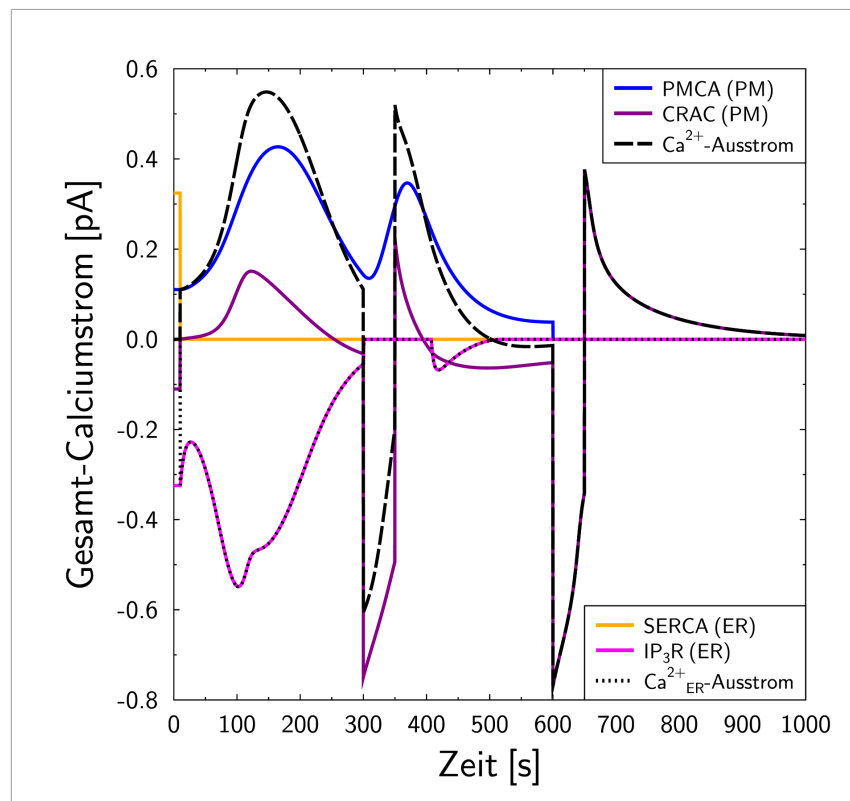


Abb. 10B: Calciumströme unter PMCA- und SERCA-Blockierung im Modell

Simulation des Experiments aus Abb. 6C in Bautista et al., 2002. Die T-Zelle befindet sich im Gleichgewichtszustand. Ab $t = 10$ s wird Gleichung C^* (38) verwendet und der SERCA-Calciumstrom wird blockiert. Bei $t = 300$ s und $t = 600$ s wird die extrazelluläre Calciumkonzentration für jeweils 50 s kurzfristig wieder auf Normalniveau gebracht. Zum Zeitpunkt $t = 600$ s wird zusätzlich der PMCA-Calciumstrom inhibiert. Die Abbildung zeigt sowohl den Calciumeinstrom durch die CRAC als auch die Anteile der PMCA und der CRAC am Calciumausstrom.

Der resultierende Anstieg der Calciumkonzentration in Abbildung 10A entspricht mit einer Amplitude von $0,8 \mu\text{M}$ dem in Abbildung 8A. Der vergleichbare Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration nach erfolgter Leerung des ER-Calciumspeichers in Abbildung 6C in Bautista et al. ist mit einer Amplitude von $0,25 \mu\text{M}$ deutlich geringer. Nach 300 s wird in der Simulation die extrazelluläre Calciumkonzentration für 50 s aktiviert, das heißt, Gleichung (38) wird kurzzeitig nicht mehr verwendet. Dies induziert einen deutlichen Calciumeinstrom durch die CRAC (Abb. 10B, violette Linie). Der Calciumpeak hat eine Amplitude von $1,23 \mu\text{M}$ (Abb. 10A, schwarze Linie). Innerhalb von 50 s wird diese erhöhte Calciumkonzentration wieder abgesenkt und es wird mit $0,05 \mu\text{M}$ ein Wert erreicht, der sich deutlich unterhalb der Ausgangskonzentration von $0,1 \mu\text{M}$ Calcium befindet. Die Senkung der Calciumkonzentration, sowohl des ER-bedingten Calciumanstiegs als auch des Peaks, erfolgt dabei überwiegend durch die PMCA (Abb. 10B, blaue Linie). Der maximale Calciumstrom, der im Modell durch sämtliche PMCA in der Plasmamembran fließt, beträgt dabei nach dem ER-bedingten Anstieg $0,45 \text{ pA}$. Nach dem darauffolgenden Peak sind es $0,33 \text{ pA}$.

1.3.2 Modell legt CRAC-Beteiligung am Calciumausstrom nahe

Da in der Simulation zunächst kein extrazelluläres Calcium zur Verfügung gestellt wird, zeigt sich im Modell jeweils eine Beteiligung des CRAC an der Absenkung des zytosolischen Calciumsignals (Abb. 10A, schwarze Linie; Abb. 10B, violette Linie). Während des ersten Anstiegs der Calciumkonzentration, der ausschließlich auf dem Ausstrom des Calciums aus dem ER beruht, strömen durch die CRAC Calciumionen mit insgesamt $0,15 \text{ pA}$ aus dem Zytosol in den Extrazellulärraum (Abb. 10B, violette Linie). Am ersten Peak ist der CRAC, in Folge der kurzen Stimulation mit extrazellulärem Calcium, mit einem Calciumeinstrom von $-0,78 \text{ pA}$ ursächlich beteiligt (Abb. 10B, violette Linie). Im Modell zeigt sich, dass nach erneuter Entfernung des extrazellulären Calciums im Anschluss an diesen Peak die CRAC mit $0,27 \text{ pA}$ ebenfalls am Calciumausstrom beteiligt sind (Abb. 10B, violette Linie). Fraglich ist jedoch, ob der CRAC einen reversen Calciumstrom, der entgegen der Richtung des bisher bekannten Calciumeinstroms erfolgt, strukturell überhaupt zulässt (siehe Kapitel V, 1.3.2). Zur Blockierung der PMCA wird – analog zur SERCA-Blockierung – mit der nächsten Simulation zum Zeitpunkt $t = 600 \text{ s}$ der PMCA-Calciumstrom der Gleichung (30) auf $I_{\text{PMCA}} = 0$ gesetzt (Abb. 10B, blaue Linie). Aufgrund der kontinuierlichen Stimulation mit Thapsigargin wird der SOCE aufgrund der erneuten 50-sekündigen extrazellulären Calciumzugabe zum Zeitpunkt $t = 600 \text{ s}$ wieder

aktiv und Calcium strömt mit einer Amplitude von -0,78 pA ein, bezogen auf den Gesamt-Calciumeinstrom durch die CRAC (Abb. 10B, violette Linie). Die zytosolische Calciumkonzentration steigt dadurch kurzzeitig auf einen Wert von 10 μM (Abb. 10A, schwarze Linie). Anschließend zeigt sich ein Absinken der Calciumkonzentration, wobei dieser zweite Calciumpeak zwar ebenso rasch sinkt wie in der vorangegangenen Simulation, die Calciumkonzentration fällt allerdings nicht mehr unter das Ausgangsniveau (Abb. 10A). Da die PMCA blockiert und kein extrazelluläres Calcium vorhanden ist, wird in diesem Fall in der Simulation der gesamte Anteil am Ausstrom des Calciums aus dem Zytosol in den Extrazellulärraum von den CRAC übernommen (Abb. 10B, violette Linie).

1.3.3 IP_3 -Dynamik durch erhöhte Calciumkonzentration

Analog zu Abbildung 9A sieht man auch in der Abbildung 10A, dass die Konzentration des IP_3 sich in Abhängigkeit der Calciumkonzentration verändert (Abb. 10A, rote Linie). Diese IP_3 -Dynamik ist darauf zurückzuführen, dass die PLC, die das IP_3 produziert, durch erhöhte Calciumkonzentrationen im Zytosol aktiviert wird (Michal, 1999).

1.4 Stimulation der T-Zelle bei gleichzeitiger PMCA-Blockierung

1.4.1 CRAC als Gegenspieler zur PMCA

Die mit dem Calciumdynamik-Modell durchgeführten Simulationen führen zu einer neuen Sichtweise auf das zytosolische Calciumsignal. Die Simulationen legen nahe, dass der Calciumeinstrom durch den CRAC im Aktivierungsprozess der T-Zelle hauptsächlich der Aufrechterhaltung des Calciumsignals dient (Abb. 7B und 8B, violette Linie). Dabei sorgen die CRAC, deren Dichte in der Plasmamembran in Folge der Abnahme der ER-Calciumkonzentration zunimmt (Abb. 7D und 9), dafür, dass die erhöhte Calciumkonzentration so lange besteht, wie es zur Weiterleitung des Signals in den Zellkern erforderlich ist.

Den Hauptanteil an der Entstehung des zytosolischen Calciumpeaks trägt der IP_3R (Abb. 7B, rosafarbene Linie). Der Peak resultiert damit direkt aus dem CICR beziehungsweise aus der IP_3 -induzierten Leerung des ER-Calciumspeichers (Abb. 9A).

Der CRAC verhindert in diesem Zusammenhang einen zu hohen Calciumverlust der aktivierten T-Zelle, die normalerweise mit einer aktiven PMCA die erhöhte Calciumkonzentration im Zytosol rasch wieder senkt (Abb. 7A, 7B, 8A und 8B). Der CRAC

fungiert nach den Erkenntnissen aus den bisherigen Simulationen folglich als „Gegenspieler“ zur PMCA.

1.4.2 Geringe Zunahme der CRAC-Dichte bei PMCA-Blockierung

Um diese Interpretation der Simulationsergebnisse zu testen, wird noch ein weiteres *in silico*-Experiment durchgeführt. Die PMCA wird dabei zum Zeitpunkt $t = 10$ s durch Setzen der Gleichung (30) auf $I_{PMCA} = 0$ inhibiert und gleichzeitig erfolgt eine Stimulation des T-Zell-Rezeptors (Abb. 11). Die SERCA bleibt in dieser Simulation intakt und extrazelluläres Calcium ist vorhanden. Gemäß der oben aufgestellten Hypothese, dürfte der CRAC in einer solchen Modellsituation aufgrund des Mangels von PMCA als Gegenspieler weniger aktiv werden als in der Simulation, deren Ergebnis in Abbildung 7 zu sehen ist. Die Rekrutierung der CRAC müsste bei blockierter PMCA geringer ausfallen, so dass die Dichtezunahme der CRAC in der Plasmamembran weniger ausgeprägt wäre, als dies in Abbildung 7D mit einer Zunahme um das 5,7-fache an Kanälen pro μm^2 zu sehen ist.

Durch die Stimulation des T-Zell-Rezeptors bei blockierter PMCA in einem ansonsten unveränderten T-Zell-Modell kommt es zu einem deutlichen Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration, wobei nach 300 s Simulationszeitraum ein Wert von $3,5 \mu\text{M}$ erreicht wird (Abb. 11, schwarze Linie). Dem Kurvenverlauf nach zu urteilen, würde die Konzentration bei längerer Laufzeit des Experiments auch darüber hinaus noch weiter zunehmen. Dabei steigt die Kurve zu Beginn der Stimulation stark an, und ab dem Zeitpunkt von 75 s verläuft die Zunahme der Calciumkonzentration etwas linearer und langsamer, doch sehr stetig. Der Anstieg der Calciumkonzentration beruht auf dem Calciumeinstrom durch den CRAC. Der Gesamtstrom durch die CRAC findet in einem Bereich statt, der etwas unterhalb von $-0,5$ pA liegt, wie es bereits in Abbildung 7B gezeigt ist. Dadurch, dass der Calciumfluss durch den CRAC nicht auf Null reduziert ist, findet kontinuierlich ein Calciumeinstrom in das Zytosol statt (Abb. 11, schwarze Linie).

Durch die Stimulation des T-Zell-Rezeptors kommt es – vermittelt durch den IP_3R – zunächst zu einem deutlichen Netto-Calciumstrom aus dem ER in das Zytosol. Da die PMCA blockiert ist, kann das zytosolische Calcium nicht in den Extrazellulärraum abfließen, sondern es wird über die SERCA ins ER zurücktransportiert. Da das zytosolische Calcium jedoch gleichzeitig als Ligand am IP_3R für eine Co-Stimulation sorgt (CICR), bleibt der IP_3R aktiv und arbeitet gegenläufig zur SERCA (Berridge, 1993). Parallel dazu

wird die IP_3 -Produktion durch die Phospholipase C aufgrund des erhöhten Calciumgehalts angeregt und der IP_3R wird dadurch zusätzlich stimuliert (Berridge, 1993; Michal, 1999). Im Verlauf der Simulation wird der ER-Calciumgehalt aufgrund der parallelen Aktivierung der SERCA und der IP_3R wieder ausgeglichen.

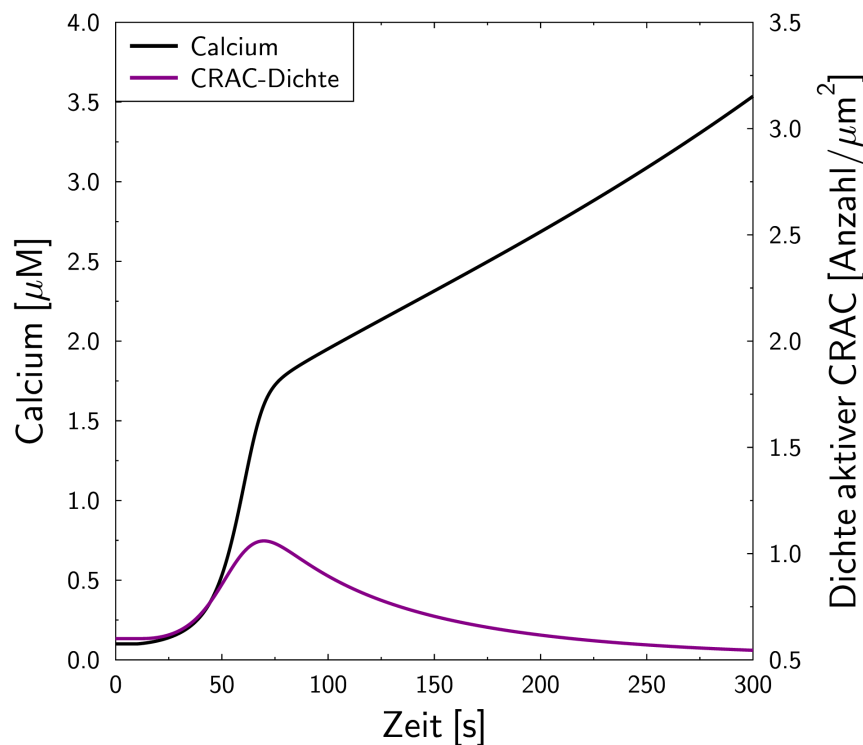


Abb. 11: CRAC-Dichte bei gleichzeitiger PMCA-Blockierung im Modell

Simulation zur Überprüfung der Resultate aus dem Modell. Die T-Zelle wird zum Zeitpunkt $t = 10$ s stimuliert, indem in Gleichung (7) $T(t) = 1,6$ gesetzt wird. Gleichzeitig wird der PMCA-Calciumstrom inhibiert. Darüber hinaus werden keine weiteren Modifikationen vorgenommen.

Aufgrund der Stimulation werden CRAC rekrutiert. Da die SERCA intakt ist, kann das ER wieder mit Calcium aufgefüllt werden, weshalb die CRAC-Dichte wieder abnimmt. Durch die bereits vorhandenen CRAC kommt es jedoch zu einem kontinuierlichen Calciumeinstrom.

Die anfängliche kurzzeitige Abnahme der Calciumkonzentration im ER bedingt zunächst die Rekrutierung der CRAC in der Plasmamembran (Abb. 11, violette Linie). Die CRAC-Dichte nimmt in der Simulation zunächst um das 1,25-fache zu (Abb. 11, violette Linie). Das ist eine sehr geringe Zunahme der CRAC-Dichte im Vergleich mit der 5,7-fachen Dichtezunahme, die bei der vergleichbaren Simulation mit aktiver PMCA erreicht werden kann (vgl. Abb. 7D). Dies zeigt, dass in der Simulation, die der Abbildung 11 zugrunde liegt, die PMCA als Gegenspieler zum CRAC fehlt und die CRAC dadurch nicht voll rekrutiert werden können. Da die Stimulation des T-Zell-Rezeptors jedoch nur einmal zum

Zeitpunkt $t = 10$ s erfolgt und keine SERCA-Blockierung durch Thapsigargin stattfindet, kann das ER nur kurz einen Netto-Calciumausstrom durch den IP_3R generieren. Der Calciumgehalt im ER bleibt anschließend für die weitere Laufzeit der Simulation relativ unverändert, wodurch die CRAC-Dichte wieder abnimmt und letztlich unterhalb des Ausgangsniveaus verbleibt (Abb. 11, violette Linie). Durch die bereits erfolgte 1,25-fache Zunahme der CRAC-Dichte aufgrund der Stimulation des T-Zell-Rezeptors zum Zeitpunkt $t = 10$ s, sind jedoch schon mehr CRAC aktiv, als es im ruhenden Zustand der Zelle der Fall wäre. Dies führt zu einem kontinuierlichen Calciumeinstrom durch die CRAC und zum zunehmenden Anstieg der Calciumkonzentration im Zytosol (Abb. 11).

2 Modellerweiterung und elektrophysiologischer Ansatz

Im Calciumdynamik-Modell der T-Zelle werden der CRAC und die PMCA in der Plasmamembran sowie der IP₃R und die SERCA in der ER-Membran berücksichtigt. Der Calciumeinstrom und -ausstrom durch die Kanäle und Pumpen wird simuliert und die resultierende Calciumdynamik, die den experimentellen Ergebnissen entspricht, kann analysiert werden. Da die Modellierung sich auf zwei Calciumkanäle und zwei Calciumpumpen beschränkt, kann die Anzahl der freien Parameter gering gehalten werden und die Einzelkanal-Charakteristika können auf Basis von Literaturdaten integriert werden. Das Calciumdynamik-Modell ist experimentell validiert (Bautista et al., 2002; Quintana et al., 2006) und kann als Ausgangspunkt für weitere Simulationen dienen (Schmeitz et al., 2013).

Um die T-Zelle *in silico* physiologischer repräsentieren zu können, wird die Weiterentwicklung des Calciumdynamik-Modells angestrebt. Mit einem komplexeren elektrophysiologischen Modell ließe sich die Aussagekraft und der prognostische Wert der Simulationen insbesondere im Hinblick auf eine zukünftige pharmakologische Anwendung erhöhen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird zur Ergänzung des Calciumdynamik-Modells ein elektrophysiologischer Ansatz konzipiert, in den zusätzliche Kanäle und Pumpen des T-Lymphozyten integriert werden. Der Modellentwurf berücksichtigt dabei neben der Calciumdynamik auch die zytosolischen Konzentrationen der Ionen Natrium und Kalium sowie das Potential der Plasmamembran und der ER-Membran.

Der Ansatz des erweiterten elektrophysiologischen Modells der T-Zelle umfasst – zusätzlich zu den Transmembranproteinen, die bereits im Calciumdynamik-Modell berücksichtigt werden – den intrazellulären RyR, den Natrium-Calcium-Kanal TRPM4, die Kaliumkanäle K_v1.3 und K_{Ca}3.1 sowie weitere Ionenpumpen für Natrium, Kalium und Calcium (siehe Kapitel II, 2.2.1) (Kelly et al., 1991; Grissmer et al., 1993; Ishida und Chused, 1993; Hohenegger et al., 2002; Launay et al., 2002). Um die Spannungsabhängigkeit der Kanäle wiedergeben zu können, muss das Membranpotential als dynamische Größe implementiert werden (vgl. Meyer-Hermann, 2007). Damit wird auch die veränderliche elektrophysiologische Situation der T-Zelle mit Auswirkungen auf die Calciumdynamik berücksichtigt (Kelly et al., 1991; Meyer-Hermann, 2007; Feske et al., 2012). Im Entwurf des elektrophysiologischen Modells wird sowohl das Potential der Plasmamembran als auch das der ER-Membran in Form einer separaten Differentialgleichung berücksichtigt.

Die Kanäle und Pumpen, die im Rahmen der elektrophysiologischen Modellerweiterung relevant sind, werden im Kontext der bisherigen Ergebnisse des Calciumdynamik-Modells in der Diskussion dargestellt (Kapitel V, 2.1). In diesem Zusammenhang wird auch die Bedeutung des dynamischen Membranpotentials für die Modellentwicklung thematisiert (siehe Kapitel V, 2.2).

Das erweiterte elektrophysiologische Modell existiert als Entwurf und derzeit sind damit noch keine relevanten Simulationsergebnisse erzielbar.

V DISKUSSION

1 Calciumdynamik im Modell versus Experiment

1.1 Konzeption des Calciumdynamik-Modells auf experimenteller Basis

In der vorliegenden Arbeit wird die Calciumdynamik eines T-Lymphozyten mit mathematischer Modellierung dargestellt. In Abhängigkeit verschiedener Stimulations-Szenarien kann mit dem Modell die resultierende Veränderung der Calciumkonzentration sowohl im Zytosol als auch im ER untersucht werden. Das Gesamtmodell wird durch *in silico*-Kombination einzelner Modellteile gebildet. Die Modellteile repräsentieren die spezifischen Eigenschaften des T-Lymphozyten, beispielsweise in Bezug auf die geometrischen Bedingungen oder die Transmembranproteine. Die Kanäle und Pumpen werden dabei hinsichtlich ihrer jeweiligen Beschaffenheit berücksichtigt und mit ihrer charakteristischen Dichte im Modell integriert. Diese detailgetreue Vorgehensweise bei der Calciumdynamik-Modellierung ermöglicht die Durchführung konkreter Analysen:

So kann zum Beispiel der Calciumstrom durch einzelne Transmembranproteine untersucht werden. Dabei kann gezeigt werden, inwieweit die einzelnen Kanäle oder Pumpen zum Gesamtstrom beitragen und an welchen Phasen des Calciumsignals sie jeweils verstärkt beteiligt sind. Durch die dynamische Berücksichtigung der CRAC-Dichte – die zum ersten Mal im Rahmen des hier vorgestellten Calciumdynamik-Modells für einen T-Lymphozyten verwirklicht wird – kann für jede Phase des Calciumsignals die Anzahl der aktiven CRAC bestimmt werden. Deren Anteil am Calciumpeak kann analysiert und mit den Resultaten aus Experimenten verglichen werden. Dadurch können neue Experimente vorgeschlagen oder Prognosen erstellt werden.

Die Simulationen zeigen, dass der Calciumeinstrom durch die CRAC infolge einer T-Zell-Aktivierung nicht auf der Steigerung der Leitfähigkeit eines einzelnen Kanals, sondern auf einer Dichtezunahme der CRAC in der Plasmamembran beruht (siehe Abb. 7 und 9). In diesem Zusammenhang kann die Abhängigkeit der CRAC-Rekrutierung von der Calciumkonzentration im ER-Lumen dargestellt werden (siehe Abb. 9A und 10A). Mit dem Modell kann nachgewiesen werden, dass die CRAC insbesondere für die Aufrechterhaltung des zytosolischen Calciumsignals zuständig (siehe Abb. 7B, 8B, 10B und 11) und für den initialen Calciumpeak eher von untergeordneter Bedeutung sind (siehe Abb. 8 und 10). Darüber hinaus lassen die Simulationen die Interpretation zu, dass die Rolle des CRAC darin liegt, als Gegenspieler zur PMCA zu fungieren (siehe Abb. 11).

Das validierte Modell kann einen Ausgangspunkt für ergänzende Analysen der Calciumdynamik in T-Zellen bilden, insbesondere im Zusammenhang mit der Erforschung von CRAC-Antagonisten.

1.1.1 Verwendung experimentell bestimmter Parameter im Modell

In das Calciumdynamik-Modell werden experimentell bestimmte Daten zur Darstellung der Charakteristika der einzelnen Transmembranproteine eingesetzt. Damit kann der Anteil an freien Parametern, die andernfalls hätten angepasst werden müssen, gering gehalten werden.

Das ohnehin bereits komplexe Modell gewinnt durch die Verwendung fester Parameter an Stabilität, wovon die durchgeführten Simulationen in Bezug auf die Validität profitieren. Das neue Calciumdynamik-Modell unterscheidet sich diesbezüglich entscheidend von den bisherigen Calcium-Modellen (siehe Kapitel II, 4.2) (vgl. Kowalewski et al. 2006; Chen et al., 2008; Martin et al., 2012). Für das SOCE-Modell von Kowalewski et al. werden Gesamt-Ionenströme betrachtet, die unter Verwendung von Konstanten errechnet werden (Kowalewski et al., 2006). Für das Modell der immunologischen Synapse von Martin et al., wird zwar insbesondere der CRAC separat betrachtet, doch werden für die Umsetzung in das Modell keine Literaturdaten, sondern angepasste Parameter verwendet (Martin et al., 2012). In beiden Modellen kann somit eine Analyse der Beteiligungen einzelner Transmembranproteine am Calciumsignal nicht erfolgen. Im Gegensatz dazu werden für das hier vorgestellte Calciumdynamik-Modell die Charakteristika der einzelnen Transmembranproteine über die Implementierung der entsprechenden Literaturwerte integriert. Alle Einzelkanal-Eigenschaften, die auf experimentell bestimmten Werten basieren, sind leicht in das Modell zu integrieren und bleiben während des „fittings“ der sonstigen Parameter unverändert. Durch diese geringe Anzahl an freien Parametern nimmt die Aussagekraft der mit dem Modell durchgeführten Simulationen zu. Die Implementierung der Einzelkanal-Eigenschaften in das Calciumdynamik-Modell kann als mehrdimensionaler Ansatz betrachtet werden: Die einzelnen Transmembranproteine werden einzeln modelliert und anschließend miteinander zu einem Gesamtmodell der T-Zelle vernetzt. Dabei werden die Kompartimente Zytosol und ER berücksichtigt. Dies ermöglicht sowohl die Analyse der Calciumströme auf der Ebene der einzelnen Kanäle und Pumpen als auch die Beobachtung der entsprechenden Auswirkungen auf die Calciumdynamik der gesamten Zelle.

Als eine Beeinträchtigung bei der hier vorgestellten Modellierung der Calciumdynamik kann in diesem Zusammenhang die Nutzung experimenteller Daten, sofern sie nicht speziell Jurkat-T-Zellen betreffen, gesehen werden. Da nicht alle erforderlichen Einzelkanal-Parameter aus Experimenten mit T-Lymphozyten übernommen werden können, muss für das Modell die folgende Annahme getroffen werden:

Das jeweilige Transmembranprotein besitzt spezifische Eigenschaften, die für jeden einzelnen Kanal- oder Pumpentyp, nach Isoformen getrennt, charakterisiert werden. Diese Eigenschaften werden jedoch in Bezug auf die jeweiligen Zelltypen, in denen das entsprechende Transmembranprotein vorkommt, als universal betrachtet. Dies gilt dementsprechend auch für die Isoformen des IP_3R (Guse et al., 1992; Sneyd und Falcke, 2005) und für die Pumpen SERCA und PMCA (Elwess et al., 1997; Caride et al., 2001a). Bei der Modellierung wird entsprechend darauf geachtet, die Daten derjenigen Isoform eines Transmembranproteins zu verwenden, die in T-Zellen vorkommt.

Innerhalb des Bezugssystems der Calciumdynamik-Modellierung werden die spezifischen Eigenschaften der T-Zelle über die ausdrückliche Berücksichtigung der Dichte der jeweiligen Transmembranproteine sowie die Repräsentation der T-Zell-typischen Kanäle und Pumpen vermittelt. Es werden dabei jeweils die Aktivierungs- und Inaktivierungsparameter sowie die spezifischen Leitfähigkeiten der Kanäle in das Modell integriert.

1.1.2 Berücksichtigung räumlicher Gegebenheiten

Im Calciumdynamik-Modell wird die Geometrie der T-Zelle berücksichtigt. Der Zellradius ist so gewählt, dass er sich auf Jurkat-T-Zellen bezieht und mit experimentellen Werten übereinstimmt (Bautista et al., 2002). Mit dem bekannten Radius der T-Zelle sind die Volumina des Zytosols und des ER berechenbar und werden in Bezug zu den jeweiligen Oberflächen der Kompartimente betrachtet (vgl. Gleichungen (10)–(22)). Die Berechnung der Oberflächengrößen ist dabei für die Darstellung der Ionenströme in den Gleichungen (1) und (4) erforderlich (Grissmer et al., 1993; Means et al., 2006; Meyer-Hermann, 2007; Parekh 2010). Bezüglich der Oberfläche des ER muss die Berechnung jedoch ausgehend von einer Kugelform ausgeführt und über einen besonderen Faktor an die reale Situation (weitverzweigte komplexe Oberfläche) angepasst werden. Für die Darstellung im Modell erscheint dies ausreichend, zumal keine experimentell bestimmten Daten über die Größe und die Oberfläche des ER in Jurkat-T-Zellen existieren (Marhl et al., 1997; Means et al.,

2006; Taylor et al., 2009). Der Zellkern wird im Modell berücksichtigt, da er das Volumen des Zytosols deutlich verkleinert und somit einen Einfluss auf die intrazelluläre Calciumkonzentration hat (vgl. Gleichungen (11) und (13)). Obwohl bekannt ist, dass die Mitochondrien an der Generierung des Calciumsignals beteiligt sind (Quintana et al., 2011; Taylor und Dale, 2012) und auch der Golgi-Apparat über Calciumkanäle verfügt (Vandecaetsbeek et al., 2011; Taylor und Dale, 2012), können die beiden Organellen aufgrund der daraus resultierenden Überparametrisierung nicht in das derzeitige Modell implementiert werden. Im Rahmen einer Weiterentwicklung des Calciumdynamik-Modells wäre die Integration zusätzlicher Organellen jedoch denkbar.

In Experimenten können lokale Calciumsignale innerhalb des Zytosols, sogenannte Mikrodomänen, beobachtet werden (Bautista und Lewis, 2004; Wu et al., 2006; Quintana et al., 2011; Martin et al., 2012). Es kommt dabei zu lokalen Inhomogenitäten der intrazellulären Calciumkonzentration an den Eintrittsstellen des Calciumstroms in das Zytosol durch den CRAC (Wu et al., 2006; Quintana et al., 2012; Martin et al., 2012). Bei der Modellierung der immunologischen Synapse durch Martin et al. werden aus diesem Grund lokale Unterschiede in der Ionenkonzentration berücksichtigt (Martin et al., 2012). Das Modell bleibt dabei allerdings auf die Schnittstelle zwischen der antigen-präsentierenden Zelle und der T-Zelle beschränkt (Martin et al., 2012).

Eine räumliche Berücksichtigung verschiedener intrazellulärer Calciumkonzentrationen ist mit dem hier vorgestellten Calciumdynamik-Modell, das sich auf den gesamten T-Lymphozyten bezieht, nicht zu erzielen. Ein solcher Ansatz würde die Komplexität des Modells signifikant erhöhen und die Anwendungsbreite dadurch einschränken. Im Calciumdynamik-Modell beziehen sich die errechneten Calciumkonzentrationen jeweils auf die durchschnittlichen Werte innerhalb der Kompartimente Zytosol und ER.

1.1 Stimulation des T-Zell-Rezeptors bei extrazellulärem Calcium

Die Simulationen repräsentieren Experimente zur Calciumdynamik in Jurkat-T-Zellen nach einer Aktivierung des T-Zell-Rezeptors. Die Aktivierung des T-Lymphozyten wird *in silico* durch manuelle Erhöhung der IP_3 -Produktion in Gleichung (7) durchgeführt. Dies bedingt die Calciumfreisetzung aus dem ER, wobei dieser Vorgang durch den CICR noch verstärkt wird. Die Simulationen werden in Analogie zu den Experimenten (Bautista et al., 2002; Quintana et al., 2006) zunächst in Gegenwart extrazellulären Calciums durchgeführt. Dabei können die experimentellen Versuchsergebnisse anhand der

Ergebnisse der Modellierung analysiert werden (siehe Abb. 7 und 9).

In den Simulationen sind sowohl die Gesamt-Calciumströme durch die Transmembranproteine als auch die jeweiligen Anteile der einzelnen Kanäle und Pumpen am Calciumsignal sichtbar (siehe Abb. 7B und 7C). Der Anstieg der CRAC-Dichte, bedingt durch die Leerung des ER-Calciumspeichers, ist *in silico* zu beobachten (siehe Abb. 7D und 9B). Die Simulationen beweisen, dass es nicht die Einzelkanal-Eigenschaften des CRAC sind, die den verstärkten Calciumeinstrom bedingen, sondern dass die Regulation über eine Dichtezunahme der CRAC stattfindet (siehe Abb. 7B, 7C und 7D sowie 9B). Dies ist in Übereinstimmung mit experimentellen Resultaten, die unabhängig von den Experimenten sind, die mit den Simulationen dargestellt werden können (Parekh, 2010; Li et al., 2011; Hou et al., 2012). Es zeigt sich, dass der CRAC durch den SOCE für die Aufrechterhaltung des Calciumsignals verantwortlich ist (siehe Abb. 7D). Der initiale Calciumpeak ist durch die Calciumfreisetzung aus dem ER – stimuliert durch IP_3 und Calcium (CICR) – bedingt (siehe Abb. 8) (vgl. Bautista et al., 2002; Luik et al., 2008). Bei intakter SERCA wird der Calciumgehalt im ER durch den Einstrom von Calcium in das Lumen wieder ausgeglichen (siehe Abb. 8B) (vgl. Bautista et al., 2002). Die Ergebnisse der Simulationen zeigen den Vorteil einer physiologischen Repräsentation des SOCE im Calciumdynamik-Modell und stellen eine Weiterentwicklung im Vergleich zu bisherigen Modellen dar (siehe Kapitel II, 4.2) (vgl. Kowalewski et al., 2006; Martin et al., 2012). Es wird deutlich, dass die dynamische Berücksichtigung der Dichten der Transmembranproteine, insbesondere des CRAC, entscheidend ist.

1.2 Stimulation der T-Zelle in calciumfreier Umgebung

Mit dem Modell kann die Rolle des CRAC nach erfolgter T-Zell-Aktivierung untersucht werden (siehe Abb. 7). In diesem Zusammenhang wird des Weiteren der Anteil der IP_3 - und Calcium-induzierten Calciumfreisetzung aus dem ER (CICR) im Vergleich zum SOCE ermittelt (siehe Abb. 8, 9 und 10). Die entsprechenden Simulationen werden, wie die zugrundeliegenden Experimente (Bautista et al., 2002; Quintana et al., 2006), ohne umgebendes extrazelluläres Calcium durchgeführt. Zwei Simulationsprotokolle kommen zur Anwendung: Um die experimentellen Ergebnisse aus Bautista et al. zu simulieren, erfolgt die Aktivierung der T-Zelle durch Stimulation der IP_3 -Produktion (siehe Abb. 7 und 8) (vgl. Abb. 2A in Bautista et al., 2002). Zur Repräsentation der Calciumdynamik, die Quintana et al. experimentell bestimmen, wird der Calciumstrom durch die SERCA in

Gleichung (32) inhibiert (siehe Abb. 9 und 10) (vgl. Abb. 1A in Quintana et al., 2006). Die extrazelluläre Calciumkonzentration wird in den Simulationen mittels Gleichung (38) nahezu auf Null gesetzt, um der experimentellen Vorgehensweise zu entsprechen (siehe Abb. 8, 9 und 10).

Anhand der Simulationen wird ersichtlich, dass der initiale Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration (Peak) eine Folge aus dem Ausstrom des ER-Calciums durch den IP_3R ist (siehe Abb. 8 und 9A). Das Modell repräsentiert zudem die Dynamik der IP_3 -Konzentration in Abhängigkeit des zytosolischen Calciums. Die IP_3 -Konzentration nimmt aufgrund der Calcium-bedingten Stimulation der Phospholipase C zu (siehe Abb. 9A und 10A) (vgl. Michal, 1999).

Der Gleichgewichtswert der IP_3 -Konzentration erweist sich in diesem Zusammenhang als kritischer Parameter bei der Modellierung. Die experimentell bestimmten IP_3 -Gleichgewichtskonzentrationen sind für T-Zellen mit Werten zwischen 100 nM und 1 μ M angegeben (Guse et al., 1992). Des Weiteren ist jedoch aus der Literatur bekannt, dass IP_3 zur Clusterbildung der IP_3R in der ER-Membran führt, und dass diese Cluster wiederum eine geringere Empfindlichkeit für IP_3 besitzen (Rahman et al., 2009; Taylor et al., 2009). In Abhängigkeit des Vor-Aktivierungsstatus der T-Zelle, könnte diese Clusterbildung die Ursache dafür sein, dass in den Experimenten relativ hohe IP_3 -Gleichgewichtskonzentrationen gemessen werden (Guse et al., 1992). Für pankreatische Zellen liegt die IP_3 -Konzentration im Ruhezustand sogar im Bereich von 300 nM (Fridlyand et al., 2003). Diese Gleichgewichtswerte passen jedoch nicht zu den Ergebnissen aus den experimentellen Untersuchungen zur Aktivierung und Inaktivierung des IP_3R in T-Lymphozyten (Mak et al., 1998; Sneyd und Falcke, 2005; Ionescu et al., 2006; Foscett et al., 2007). Um eine Änderung der Öffnungswahrscheinlichkeit des IP_3R zu erreichen, muss hier ein effektiver Anstieg der IP_3 -Konzentration möglich sein (vgl. Abb. 6 in Kapitel III, 2.6.2) (Mak et al., 1998). Die IP_3 -Ausgangskonzentration in T-Zellen muss daher deutlich niedriger liegen (De Young und Keizer, 1992; Schmeitz et al., 2013). Im Calciumdynamik-Modell wird ein Wert von 8,7 nM verwendet (De Young und Keizer, 1992). Dieser Wert ist mit einem QI von 318% als kritischer Parameter zu bewerten (vgl. Tab. 1 in Kapitel III, 2.8). Das heißt, das Modell reagiert auf Änderungen der IP_3 -Gleichgewichtskonzentration sehr sensibel. Es sind jedoch keine ausreichenden Literaturdaten zur IP_3 -Konzentration verfügbar. Daher muss der IP_3 -Ruhewert für das bestehende Modell als verlässlich erachtet werden, zumal die experimentellen Verhältnisse mit den generierten Simulationen reproduziert werden können (vgl. Abb. 6 in Kapitel III, 2.6.2) (Mak et al., 1998).

1.3 PMCA- und SERCA-Blockierung ohne extrazelluläres Calcium

1.3.1 Calciumströme bei Blockierung der PMCA

Mit dem Calciumdynamik-Modell kann analysiert werden, welche Transmembranproteine am Ausstrom des Calciums nach einer Aktivierung der T-Zelle beteiligt sind. Im Experiment, welches den Simulationen zugrunde liegt, wird die T-Zelle mit Thapsigargin aktiviert und die PMCA mit La^{3+} beziehungsweise mit Carboxyeosin blockiert (Abb. 6C und 6D in Bautista et al., 2002). Infolgedessen ist eine deutliche Reduktion in der Geschwindigkeit bei der Senkung der erhöhten Calciumkonzentration beobachtbar (Abb. 6C und 6D in Bautista et al., 2002).

In diesem Zusammenhang erscheint die Verwendung von La^{3+} in der Abbildung 6C in Bautista et al. problematisch, da La^{3+} als CRAC-Inhibitor bekannt ist (Aussel et al., 1996; Feske et al., 2012). Der Calciumpeak erscheint in der Abbildung 6C als Folge der Zugabe extrazellulären Calciums – gleichzeitig wird jedoch der PMCA- und CRAC-Antagonist La^{3+} zugegeben (Abb. 6C in Bautista et al., 2002). Würden die CRAC parallel zur Zugabe des extrazellulären Calciums eine Inhibierung durch La^{3+} erfahren, so gäbe es keinen Calciumeinstrom und damit auch keinen Calciumpeak, es sei denn, die CRAC-Blockierung wäre aufgrund einer zu geringen La^{3+} -Konzentration inkomplett oder der Peak würde durch andere Calciumkanäle generiert (Aussel et al., 1996; Feske et al., 2012). Die Frage bleibt also, ob der CRAC trotz einer Blockierung mit La^{3+} noch teilweise funktionsfähig ist, oder ob das La^{3+} später zugegeben wird, als es der Graphik zu entnehmen ist (Abb. 6C in Bautista et al., 2002).

Es wäre des Weiteren zu untersuchen, durch welche Kanäle das Calcium ausströmen kann, wenn die PMCA blockiert ist. In Frage käme die Natrium-Calcium-Pumpe (NaCa), deren Existenz in T-Lymphozyten jedoch umstritten ist (Kapitel V, 2.1.3) (Berridge et al., 2003; Feske, mdl. Mitt. 07/2012). Eine andere Möglichkeit bestünde in einem Umkehrstrom durch den CRAC (Kapitel V, 1.3.2).

Im Modell kann eine Simulation mit einer PMCA- und CRAC-Blockierung entsprechend des Bautista-Experiments mit La^{3+} durchgeführt werden (Abb. 6C in Bautista et al., 2002). Bei einer Aktivierung der T-Zelle mit Thapsigargin kommt es, wie erwartet, aufgrund der CRAC-Inhibierung jedoch nicht zu einem Calciumpeak. Folglich kann auch die Absenkung der erhöhten Calciumkonzentration, die in Bautista et al. gezeigt wird, mit dem Modell nicht untersucht werden (Abb. 6C in Bautista et al., 2002).

Die Simulationen, die analog zur Abbildung 6D in Bautista et al. mit dem PMCA-Antagonisten Carboxyeosin durchgeführt werden, können das Experiment repräsentieren (siehe Abb. 10) (vgl. Abb. 6D in Bautista et al., 2002). Mit dem Modell können darüber hinaus die entsprechenden Gesamt-Calciumströme, die durch die Transmembranproteine fließen, analysiert werden (siehe Abb. 10B). Demnach findet bei blockierter PMCA der Calciumausstrom durch den CRAC statt (siehe violette sowie schwarze, gestrichelte Linie in Abb. 10B).

1.3.2 Erlaubt der CRAC einen Calciumausstrom?

Im Experiment von Bautista et al., das anhand der Simulationen analysiert werden kann, wird die PMCA durch Carboxyeosin blockiert (Abb. 6D in Bautista et al., 2002). Dennoch erfolgt eine Absenkung des Calciumpeaks im Experiment, zwar mit etwas größerer Zeitkonstante, aber es kann ein Ausströmen des Calciums aus dem Zytosol beobachtet werden. Da die SERCA inhibiert ist, kann dies nicht daran liegen, dass das Calcium in das ER aufgenommen wurde. Es stellt sich die Frage, woraus die Absenkung der zytosolischen Calciumkonzentration resultiert, die sich dabei sowohl im Experiment (Abb. 6D in Bautista et al., 2002) als auch in der Simulation zeigt (Abb. 10). Dies könnte entweder an einer inkompletten Blockierung der PMCA liegen, oder an anderen Kanälen in der Plasmamembran, die Calcium nach außen leiten. Darüber hinaus könnte es an einer Umkehrung des Calciumstroms durch den CRAC liegen. Letzteres legen die Ergebnisse der Simulation nahe (siehe Abb. 10). Hinsichtlich der Kristall-Struktur des CRAC, der sich als hexamerischer Kanal aus ORAI-Protein-Helices formt, erscheint ein umgekehrter Calciumstrom durch den CRAC allerdings unwahrscheinlich zu sein (Hou et al., 2012). Insofern ist davon auszugehen, dass der Calciumausstrom durch andere Transmembranproteine, die im bisherigen Modell nicht integriert sind, erfolgt. In einer Erweiterung des Modells würde sich die Möglichkeit anbieten, in diesem Zusammenhang die NaCa zu berücksichtigen (Kapitel V, 2.1.3) (Balasubramanyam et al., 1994; Berridge et al., 2003; Feske, mdl. Mitt. 07/2012).

1.4 Stimulation der T-Zelle bei gleichzeitiger PMCA-Blockierung

Die Simulationen führen zu der Erkenntnis, dass der CRAC als Gegenspieler der PMCA fungiert (siehe Abb. 7A, 7B, 8A und 8B). Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wird ergänzend eine Simulation durchgeführt, bei der die PMCA blockiert ist, ohne dass darüber hinausgehende Veränderungen an der T-Zelle vorgenommen werden (siehe Abb. 11). Bei inhibierter PMCA erfolgt aufgrund der Leerung des ER-Calciumspeichers zwar eine Rekrutierung der CRAC, doch diese kann nur mit verminderter Intensität stattfinden (siehe Abb. 11). Eine vergleichbare Dichtezunahme der CRAC, wie dies bei funktionierender PMCA der Fall ist (siehe Abb. 7D), ist nicht zu beobachten, so dass die Interpretation der bisherigen Ergebnisse, bei der die CRAC als Gegenspieler der PMCA zu sehen sind, als richtig erachtet werden kann.

Die verminderte Dichtezunahme der CRAC in einer Simulation mit blockierter PMCA ist im Kontext der raschen Wiederauffüllung des ER durch die SERCA zu sehen. Die SERCA ist in der durchgeführten Simulation intakt und bewirkt, dass die erhöhte Calciumkonzentration im Zytosol durch Aufnahme des Calciums in das ER-Lumen wieder sinkt (siehe Abb. 11). Dadurch können keine weiteren CRAC rekrutiert werden (Luik et al., 2008). Dabei ist für das Calciumdynamik-Modell mit der SERCA2b eine Isoform integriert, die bereits bei einer relativ geringen Zunahme der zytosolischen Calciumkonzentration mit $C_{SERCA2b} = 0,25 \mu\text{M}$ (siehe Kapitel III, 2.6.4) aktiv wird (Chandrasekera et al., 2009). Die SERCA2b ist die hauptsächlich vorkommende Isoform in Jurkat-T-Zellen, doch sind auch langsamere Isoformen vorhanden (Lytton et al., 1992). Bei einer zusätzlichen Berücksichtigung beispielsweise der SERCA3, die erst bei höheren Calciumkonzentrationen im Vergleich mit der SERCA2b aktiv wird ($C_{SERCA3} = 1 \mu\text{M}$), würde eine Wiederauffüllung des ER-Lumens später erfolgen (Lytton et al., 1992). Dadurch wären insgesamt mehr CRAC rekrutierbar und es könnte eine stärkere Dichtezunahme beobachtet werden als in Abbildung 11 gezeigt.

In diesem Zusammenhang wäre die Durchführung eines Experiments zur Validierung des Simulationsergebnisses interessant. Dabei würde sich jedoch wahrscheinlich der kontinuierliche Anstieg der Calciumkonzentration im Zytosol, der trotz einer funktionierenden SERCA in der Simulation beobachtet werden kann, als kritische Konzentration für die T-Zelle im Versuch erweisen.

2 Elektrophysiologischer Modellansatz

2.1 Integration zusätzlicher Transmembranproteine

In T-Lymphozyten gibt es neben den bisher berücksichtigten Kanälen CRAC und IP₃R sowie den Pumpen PMCA und SERCA weitere Calciumkanäle (Grafton und Thwaite, 2001). Darüber hinaus können Kalium- und Natriumkanäle sowie -pumpen nachgewiesen werden (Cahalan und Chandy, 2009; Feske et al., 2012). Analog zu dem Modell der Betazelle von Meyer-Hermann, 2007, wird im Rahmen der Modellerweiterung ein Ansatz zum Ionendynamik-Modell der T-Zelle entworfen. Für das erweiterte Modell, welches analog zu Gleichung (1) auch die Konzentrationen von Natrium und Kalium im Zytosol in Betracht zieht, wird daher die Berücksichtigung eines weiteren Calciumkanals und eines Calcium-Natrium-Kanals erwogen. Darüber hinaus werden zwei Kaliumkanäle und zwei Ionentransporter dargestellt.

2.1.1 Erweiterung des Modells um zwei Calcium- sowie Natrium-Kanäle

2.1.1.1 Ryanodin-Rezeptor (RyR)

An der Calciumdynamik in einem aktivierten T-Lymphozyten, dargestellt in den Abbildungen 7A, 8A, 9A, 10A und 11, sind neben den genannten Calciumkanälen und -pumpen weitere Calciumkanäle beteiligt, so zum Beispiel der RyR in der ER-Membran (Grafton und Thwaite, 2001; Hohenegger et al., 2002; Schwarzmann et al., 2002). Dieser wird durch Calcium und durch den „second messenger“ NAADP aktiviert und lässt Calcium aus dem ER-Lumen in das Zytosol der T-Zelle strömen (Hohenegger et al., 2002; Cheng et al., 2008; Williams et al., 2011). Dabei wird ein maximaler Calciumstrom von -0,2 pA erreicht (Williams et al., 2011). Ein Wert für die Dichte der RyR in der ER-Membran ist nicht bekannt. Im Modell wird der Calciumausstrom aus dem ER bisher ausschließlich durch den IP₃R reguliert. Diese Regulation erscheint im Modell jedoch bereits ausreichend zu sein (siehe Abb. 7B und 7C). Da die Aktivierung des RyR neben Calcium auch durch NAADP erfolgt, würde die Implementierung dieses weiteren ER-Rezeptors die Integration eines zusätzlichen „second messengers“ erfordern. Dies würde die Komplexität des Modells und damit die Anzahl an Parametern deutlich erhöhen, zumal die Dichte der RyR nicht bekannt ist.

2.1.1.2 „Transient Receptor Potential Melastatin 4“ (TRPM4)

Der Kationenkanal TRPM4 leitet sowohl monovalente Ionen, darunter Natrium und Kalium, als auch divalente Ionen, darunter Calcium, aus dem Extrazellulärraum in das Zytosol (Nilius et al., 2003; Launay et al., 2004). Die Leitfähigkeit des TRPM4 ist spannungs- und calciumabhängig (Nilius et al., 2005; Launay et al., 2002), jedoch ist kein exakter Leitfähigkeitswert bekannt. Der maximale Ionenstrom ist mit -2,2 pA angegeben, allerdings bezieht sich diese Angabe ausschließlich auf Natriumionen (Nilius et al., 2003). Bezüglich der Dichte der TRPM4 in der Plasmamembran liegen keine Daten vor. Der TRPM4 ist an der Depolarisation der T-Zelle nach erfolgter Stimulation des T-Zell-Rezeptors beteiligt (Launay et al., 2002). Der Ioneneinstrom in die Zelle dient somit der Aktivierung und würde sich unter anderem verstärkend auf das Calciumsignal in den Abbildungen 7A und 10A auswirken. In diesem Zusammenhang ließe sich untersuchen, ob der Ionenstrom durch den TRPM4 als Ausgleich zum Calciumausstrom durch die PMCA (siehe Abb. 7B) zu sehen ist und somit unterstützend zum CRAC-Calciumeinstrom der Aufrechterhaltung der T-Zell-Aktivierung dient.

Eine Implementierung des TRPM4 in das Calciumdynamik-Modell wird im Rahmen der Modellerweiterung versucht. Der Ionenstrom wird sowohl in Abhängigkeit der Spannung als auch calciumabhängig modelliert. Als problematisch erweist sich, dass den Literaturdaten nicht entnommen werden kann, in welchem Verhältnis die Kationen Calcium und Natrium geleitet werden. Im Modellansatz kann daher lediglich eine Beschränkung auf Natriumionen erfolgen, da bezüglich des Calciumstroms keine ausreichende experimentelle Datenlage vorliegt. Auswirkungen auf die Calciumdynamik sind somit nicht beobachtbar.

2.1.2 Kaliumkanäle zum Ausgleich des depolarisierten Membranpotentials

2.1.2.1 Spannungsabhängiger Kaliumkanal (K_v1.3)

Der K_v1.3 in der Plasmamembran von T-Lymphozyten wird durch eine Depolarisation aktiviert, so dass Kaliumionen aus dem Zytosol in den Extrazellulärraum strömen können (Kelly et al., 1991; Lee et al., 1992; Ishida und Chused, 1993). Die Depolarisierung resultiert aus dem Einstromen von Calciumkationen durch den CRAC beziehungsweise durch die Calcium-Freisetzung aus dem ER durch den IP₃R (siehe Abb. 7, 8 und 9). Durch das Ausströmen von Kaliumkationen wird die Depolarisierung elektrisch ausgeglichen (Kelly et al., 1991; Grissmer et al., 1993). Die Aktivierung der T-Zelle, verbunden mit dem

Einströmen von Calcium, kann dadurch länger aufrechterhalten werden. Die maximale Leitfähigkeit des $K_v1.3$ liegt bei 9 pS und der Kanal wird in Abhängigkeit der Spannung aktiviert (Lee et al., 1992; Kelly et al., 1991). Die Anzahl der $K_v1.3$ in der Plasmamembran nimmt mit der Aktivierung zu (Decoursey et al., 1987; Cahalan et al., 1985; Grissmer et al., 1993).

2.1.2.2 Calciumabhängiger Kaliumkanal ($K_{Ca}3.1$)

Der $K_{Ca}3.1$ ist ein calciumabhängiger Kanal in der Plasmamembran von T-Zellen (Grissmer et al., 1993). Bei einer Aktivierung der T-Zelle und damit einer steigenden zytosolischen Calciumkonzentration bindet das Calcium als Ligand an den $K_{Ca}3.1$ (Grissmer et al., 1993). Der Kanal öffnet sich und Kaliumionen strömen aus dem Zytosol in den Extrazellulärraum. Mit dem Ausstrom der Kaliumkationen durch den $K_{Ca}3.1$ wird – wie auch durch den $K_v1.3$ – das Membranpotential der T-Zelle elektrisch ausgeglichen und das Calciumsignal stabilisiert (Grissmer et al., 1993). Für die Leitfähigkeit des $K_{Ca}3.1$ sind in der Literatur unterschiedliche Werte zu finden, die im Bereich zwischen 11 pS und 220 pS liegen (Grissmer et al., 1993; Meyer-Hermann, 2007). Die Dichte der $K_{Ca}3.1$ nimmt mit der Aktivierung der T-Zelle zu (Grissmer et al., 1993).

Beide Kanäle zeigen somit einen indirekten Einfluss auf die Calciumdynamik in der T-Zelle und könnten sowohl die Amplitude als auch die Dauer des Calciumsignals (siehe Abb. 7A, 8A und 9A) beeinflussen. Aufgrund der Bedeutung des $K_v1.3$ und des $K_{Ca}3.1$ für den Ausgleich des Membranpotentials der T-Zelle und für die Aufrechterhaltung des Calciumsignals werden beide Kanäle im erweiterten elektrophysiologischen Ionendynamik-Modell berücksichtigt.

2.1.3 **Berücksichtigung zusätzlicher Ionenpumpen**

2.1.3.1 Natrium-Kalium-ATPase (NKA)

Die Natrium-Kalium-Pumpe in der Plasmamembran von T-Zellen transportiert pro Umsetzungsvorgang jeweils drei Natriumionen in den Extrazellulärraum und im Gegenzug dafür zwei Kaliumionen in das Zytosol (Ishida und Chused, 1993; Rakowski et al., 1997). Damit ist der Netto-Ionenstrom positiv. Der Transport erfolgt sowohl entgegen des chemischen Konzentrationsgradienten als auch des elektrischen Ladungsgradienten und verbraucht ATP (Rakowski et al., 1997). Der maximale Ionenstrom durch die Na^+/K^+ -

Pumpe beträgt 0,00003 pA, errechnet aus der ATP-Umsetzungsrate (Maixent und Berrebi-Betrand, 1993; Meyer-Hermann, 2007). Die Aktivierung erfolgt in Abhängigkeit der Konzentrationen an Natrium und Kalium (Chapman et al., 1983; Dobretsov und Stimers, 1996). Die Dichte der Na^+/K^+ -Pumpe in der Plasmamembran ist mit 310 Proteinen pro μm^2 angegeben (Severini et al., 1987).

Die Natrium-Kalium-ATPase sorgt für den Ausgleich der Kaliumkonzentration im Zytosol. Das durch die Kaliumpumpen $\text{K}_v1.3$ und $\text{K}_{Ca}3.1$ ausströmende Kalium, welches dem Ausgleich der erhöhten Calciumkonzentration im Zytosol dient, wird mit dem Abklingen der T-Zell-Aktivierung mittels des KaliumEinstroms durch die Na^+/K^+ -Pumpe wieder ersetzt. Daher wirkt sich die Pumpe sekundär auch auf die Calciumdynamik aus und wird in das erweiterte elektrophysiologische Modell integriert.

2.1.3.2 Natrium-Calcium-Pumpe (NaCa)

Die Existenz der Natrium-Calcium-Pumpe in T-Lymphozyten ist umstritten (Berridge et al., 2003; Feske, mdl. Mitt. 07/2012). Auf Basis experimenteller Untersuchungen an T-Lymphozyten, bei denen durch ein natriumhaltiges Umgebungsmedium der Ausstrom an zytosolischem Calcium erhöht werden kann, befürworten manche Autoren die Existenz der Natrium-Calcium-Pumpe in T-Zellen (Balasubramanyam et al., 1994). Die NaCa gibt es in vielen Zelltypen, darunter auch in pankreatischen Betazellen (Blaustein und Lederer, 1999; Meyer-Hermann, 2007). Der Transport von Natrium in die Zelle durch die NaCa ist an den Ausstrom von Calcium gekoppelt und findet ohne ATP-Verbrauch statt (Blaustein und Lederer, 1999). Aktiviert wird die NaCa durch eine erhöhte zytosolische Calciumkonzentration, wobei ein maximaler Ionenstrom von -0,0005 pA gemessen werden kann (Juhaszova et al., 2000).

Jedoch trägt die NaCa in den Versuchen von Bautista et al. offensichtlich nicht zum Ausstrom des Calciums nach erfolgter T-Zell-Aktivierung bei (Bautista et al., 2002). Des Weiteren konnte ein genetischer Nachweis für die Existenz der Pumpe in Jurkat-T-Zellen bisher nicht erbracht werden (Donnadieu et al., 1993; Wu et al., 2009). Daher wird die NaCa im erweiterten elektrophysiologischen Modell nicht berücksichtigt. Da Natrium jedoch in die T-Zelle gelangen muss, um als Gegenkation zu Kalium durch die Natrium-Kalium-ATPase wieder ausströmen zu können, muss dieser Transport entweder durch den TRPM4 oder durch das Transmembranprotein P2X erfolgen (Launay et al., 2002; Feske et al., 2012). Der TRPM4 ist in der Modellerweiterung integriert und kann als Kanal für den Natriumeinstrom fungieren.

2.2 Berücksichtigung der Elektrophysiologie

Bei der Umsetzung dieses komplexen T-Zell-Modells bereitet die Realisierung des ER-Membranpotentials im Modell Schwierigkeiten, da die zur Berechnung erforderlichen Parameter nicht in ausreichendem Maße in Form von Literaturdaten vorliegen (Marhl et al., 1997; Taylor et al., 2009). Dies ist darauf zurückzuführen, dass im Experiment normalerweise Spannungsklemmen-Messungen durchgeführt werden, um das Membranpotential zu erfassen (Neher und Sakmann, 1976; Hamill et al., 1981; Matteson und Deutsch, 1984; Gardner, 1990). Die Messung des Membranpotentials des Endoplasmatischen Retikulums gestaltet sich jedoch schwierig, da das ER ein intrazelluläres Kompartiment ist und eine Spannungsklemmen-Messung zur Zerstörung der intakten Zelle beziehungsweise zu einer Veränderung der Ionenverhältnisse mit Auswirkungen auf das ER-Membranpotential führen würde (Rahman und Taylor, 2010). In diesem Zusammenhang ergeben sich Probleme mit dem IP_3R -Umkehrpotential, welches zur Berechnung des Stromflusses durch den IP_3R benötigt wird (Rahman und Taylor, 2010; Meyer-Hermann, 2007). Das Gesamtmodell der T-Zell-Elektrophysiologie kann im Rahmen der vorliegenden Arbeit unter anderem aufgrund der geschilderten Problematik bei der Umsetzung des ER-Membranpotentials nicht abschließend realisiert werden.

Aus experimentellen und technischen Gründen sind mit dem Gesamtmodell bisher keine validierbaren Ergebnisse erzielbar.

VI AUSBLICK

1 Pharmakologische Relevanz des Calciumdynamik-Modells

Mit dem im Rahmen der Dissertation entwickelten Calciumdynamik-Modell der T-Zelle könnten *in silico*-Untersuchungen potentieller Antagonisten des CRAC im Zusammenhang mit der Erforschung neuer Immunsuppressiva zur Therapie der Transplantatabstoßung durchgeführt werden.

Das vorgestellte Modell ist hierfür besonders geeignet, da es eine physiologische Umsetzung der T-Zell-spezifischen Eigenschaften bezüglich der Kanal-Charakteristika und der Dichten der Transmembranproteine in den Membranen realisiert. Insbesondere für den CRAC sind mit dem derzeitigen Modell detaillierte Analysen möglich, die Aufschluss darüber geben, inwieweit der Kanal zu einem bestimmten Zeitpunkt unter gegebenen Bedingungen aktiv ist. Bei einem *in silico*-Einsatz von Antagonisten des CRAC in einem weiterentwickelten pharmakologischen Calciumdynamik-Modell wären in kurzer Zeit Rückschlüsse auf den Aktivierungszustand des T-Lymphozyten und somit auf die Wirksamkeit der Testsubstanzen möglich. Der Calciumeinstrom durch einen einzelnen CRAC ist bereits im bisherigen Modell separat darstellbar und kann im Kontext der anderen Calcium-leitenden Transmembranproteine betrachtet werden. Die Auswirkungen auf die Calciumdynamik in der T-Zelle, die sich aus einer Veränderung des CRAC ergeben – zum Beispiel durch CRAC-Inhibitoren – könnten demnach in einem pharmakologischen Modell *in silico* nachvollzogen werden.

Für ein solches Modell bedarf es einer Weiterentwicklung des bisher bestehenden grundlegenden Calciumdynamik-Modells. Ein erster Ansatz zur Erweiterung der Komplexität hinsichtlich einer pharmakologischen Verwendung ist die Integration zusätzlicher Transmembranproteine (siehe Kapitel V, 2.1). Da vor allem die Kaliumkanäle eine wesentliche Rolle bei der Steuerung des Calciumsignals ausüben, ist deren Berücksichtigung im Modell wesentlich, um die Auswirkungen von CRAC-Blockern und die resultierende Veränderung der Calciumdynamik detaillierter analysieren zu können. Da die Kaliumkanäle in direktem Kontext zur elektrophysiologischen Situation der T-Zelle zu sehen sind, ist des Weiteren die dynamische Berücksichtigung des Plasmamembran-Potentials sowie des ER-Membranpotentials sinnvoll (siehe Kapitel V, 2.2).

Zusätzlich müsste der CRAC, der in einem solchen pharmakologischen Modell der T-Zelle von zentraler Bedeutung ist, komplexer modelliert werden. Relevant für das Modell wäre hier die strukturelle Darstellung des CRAC und eine Repräsentation der Ligandenbindung an die ORAI-Proteine im Modell (DeHaven et al., 2008; Hou et al., 2012). Schließlich müssten für ein pharmakologisches Modell natürlich auch die CRAC-Antagonisten modelliert werden (Merritt et al., 1990; Aussel et al., 1996; Bakowski et al., 2000; Trevillyan et al., 2001; Parekh, 2010; Feske, 2007). Dazu müssten die Simulationen auf molekularer Ebene erfolgen und Strukturveränderungen der zu testenden Derivate wären im Modell zu berücksichtigen. Dennoch könnten mit einem ausschließlich zellulären Modell keine Aussagen bezüglich möglicher Nebeneffekte der untersuchten CRAC-Blocker getroffen werden. Um eine solche universal-systembiologische Aussage zu ermöglichen, müssten mehrere Modelle, die sowohl molekulare als auch zelluläre und Gewebe-basierende Ebenen enthalten, gekoppelt werden. Eine solche Komplexität reicht jedoch über den Modellierungs-Ansatz der vorliegenden Arbeit deutlich hinaus.

Die Bedeutung der Entwicklung eines solchen pharmakologischen Calciumdynamik-Modells für die T-Zelle (beziehungsweise in einem zweiten Schritt für einen Zellverband), soll im Folgenden kurz aufgezeigt werden. Dazu wird die Relevanz der Erforschung von CRAC-Antagonisten – derzeit *in vitro* – kurz im Kontext der Transplantationsimmunologie dargestellt.

1.1 Bedeutung des CRAC für Transplantationen

In Mäusen mit einem homozygoten *knockout* für das „CRAC-Gen“ *orai1* verursacht die transplantierte Haut einer Spender-Maus, die bezüglich ihrer MHC-Moleküle nicht mit dem Empfängertier übereinstimmt, im experimentellen Beobachtungszeitraum – im Vergleich zu Mäusen ohne *orai1-knockout* – keine Abstoßungsreaktion (McCarl et al., 2010). Das bedeutet, dass durch die Unterbindung der funktionalen CRAC-Genese in T-Lymphozyten und damit durch die Inhibierung des SOCE eine erhöhte Akzeptanz von Allotransplantaten erreicht werden kann. Diese Erkenntnis ließe sich pharmakologisch umsetzen und würde den therapeutischen Einsatz von Antagonisten des CRAC in der Transplantationsmedizin begründen. Andererseits verursachen Störungen in der Ausbildung des CRAC schwere Immunerkrankungen (siehe Kapitel V, 1.2). In diesem Zusammenhang sind bei einer klinischen Anwendung von CRAC-Antagonisten schwerwiegende Nebenwirkungen zu erwarten (Parekh, 2010; Feske, 2007).

1.2 Immunerkrankungen aufgrund abnormer CRAC-Funktion

Defekte Lymphozyten können ein pathologisch verändertes Calciumsignal aufweisen (Partiseti et al., 1994; Feske et al., 2005; Gwack et al., 2008). Dies kann sich klinisch in einer angeborenen Immunerkrankung manifestieren (Partiseti et al., 1994). Einhergehend mit einer Verminderung des charakteristischen Anstiegs der Calciumkonzentration oder einem Ausbleiben der Calciumdynamik nach erfolgter Aktivierung in T-Lymphozyten können die Immundefekte auf einer abnormen Funktion des CRAC beruhen (Partiseti et al., 1994; Le Deist et al., 1995; Feske et al., 2005). Der SOCE kann dann in den T-Zellen nicht stattfinden (Le Deist et al., 1995; Feske et al., 1996; Gwack et al., 2008). Ursache der sogenannten „CRAC channelopathies“ können autosomal rezessive Mutationen im *orai1*-Gen oder Veränderungen im *stim1*-Gen sein, wobei für eine Erkrankung jeweils beide Allele bezüglich der Mutation homozygot vorliegen müssen (Feske et al., 2006; Gwack et al., 2008; Feske, 2011). Das Fehlen funktioneller CRAC führt dazu, dass keine Calcium-initiierte NFAT-Aktivierung erfolgen kann, wodurch weder die Proliferation der T-Lymphozyten noch die Zytokin-Sezernierung stattfinden kann (Feske et al., 1996). Es kommt zur Ausprägung eines klinischen Phänotyps. Dieser zeigt sich einerseits als immunologisches Erkrankungsbild, andererseits aber auch in Kombination mit nicht-immunologischen Störungen, darunter Muskelerkrankungen und Zahnschmelz-Fehlbildungen (McCarl et al., 2009; Feske, 2011). Die Erkrankung des Immunsystems nimmt dabei schwere Verläufe in Form von „Severe Combined Immunodeficiency Disorders“ (SCID) und resultiert in einer sehr hohen Sterblichkeitsrate (Feske, 2007). Weitere Krankheitsbilder, die mit Defekten in der Ausbildung eines funktionellen CRAC in Verbindung gebracht werden, sind Allergien, entzündliche Darmerkrankungen, Brustkrebs und eine Neigung zur Thrombosebildung (Parekh, 2010).

2 Transplantationsimmunologie

2.1 Verlauf einer Transplantation

Bei einer allogenen Transplantation werden Gewebe oder Organe eines meist hereditär unterschiedlichen Spenders auf einen Empfänger übertragen. Transplantiert werden können Nieren, Leber, Herz, Lungen, Pankreas, Dünndarm sowie entvaskularisierte und vaskularisierte Gewebe (Breidenbach und Banas, 2001). Soll eine Organentnahme durchgeführt werden, so muss beim Spender rasch mit einer organprotektiven Intensivtherapie begonnen werden, um Organschäden vorzubeugen (Breidenbach und Banas, 2011). Neben der zeitlich begrenzten Aufrechterhaltung des Kreislaufs müssen weitere intensivmedizinische Maßnahmen eingeleitet werden, um das Eintreten pathophysiologischer Veränderungen bis zum kurzfristigen Zeitpunkt der Organentnahme zu vermeiden. Beispielsweise muss die Hochregulation der Zytokin-Sezernierung, die aufgrund des Hirntods einsetzt, durch die Gabe von Steroiden, zum Beispiel Methylprednisolon, verhindert werden (Breidenbach und Banas, 2011). Während der Explantation wird das Organ perfundiert und gekühlt, um die Erhaltung der Organfunktion zu gewährleisten. Der Erfolg der Transplantation ist im Anschluss an die Organübertragung von einer konsequenten immunsuppressiven Behandlung des Empfängers abhängig, um die Abstoßung des allozierten Organs zu verhindern (Breidenbach und Banas, 2011).

2.2 Transplantatabstoßung

Die MHC-Alloantigene (HLA) des Spenderorgans werden durch das Immunsystem des Empfängers als fremd erkannt und das Transplantat wird abgestoßen (Zinkernagel und Doherty, 1974; Shiina et al., 2009; García et al., 2012; Kumbala und Zhang, 2013). Da bezüglich des MHC-Genkomplexes ein ausgeprägter genetischer Polymorphismus vorliegt, gibt es in der Zusammensetzung der MHC-Moleküle erhebliche Unterschiede (Horn et al., 2005; Shiina et al., 2009). Um die Immunreaktion auf das Transplantat möglichst gering zu halten, werden bereits im Vorfeld der Transplantation Typisierungen der Gewebemerkmale des Spenders sowie der potentiellen Empfänger vorgenommen (Kumbala und Zhang, 2013). Die Erfolgsprognose bezüglich des Überlebens des transplantierten Organs hängt unter anderem sowohl von der Blutgruppe als auch vom Grad der übereinstimmenden Allele der HLA ab (Horn et al., 2005; Shiina et al., 2009; Kumbala und Zhang, 2013). Bei der HLA-Typisierung wird daher der sogenannte HLA-Match zwischen

Spender und Empfänger überprüft (Shiina et al., 2009). Da bei den HLA-Genloci multiple Allelie besteht, muss ein bestimmter Grad an Nicht-Übereinstimmung zwischen Spender und Empfänger akzeptiert werden. Ein sogenannter Mismatch von 0 wäre die bestmögliche Übereinstimmung, diese liegt jedoch nur bei eineiigen Zwillingen vor. In der Regel wird versucht, das Ausmaß der differierenden HLA-Allele möglichst gering zu halten (Breidenbach und Banas, 2011).

Mit den im Vorfeld einer Transplantation durchgeführten Tests wird angestrebt, die Immunreaktion des Organempfängers gegenüber dem Transplantat auf eine medizinisch und pharmakologisch kontrollierbare Intensität zu begrenzen (Breidenbach und Banas, 2011). In jedem Fall ist intra- und postoperativ die Gabe von Immunsuppressiva unabdingbar (Breidenbach und Banas, 2011). Da die immunsuppressive Therapie in der Regel dauerhaft stattfinden muss, sollte durch Auswahl der geeigneten Arzneistoffe das Risiko von Nebenwirkungen und Langzeitkomplikationen reduziert werden (Breidenbach und Banas, 2011).

2.3 Pharmakotherapie der Transplantatabstoßung

2.3.1 Therapie mit Immunsuppressiva

2.3.1.1 Behandlungsschema

Das Schema der immunsuppressiven Behandlung sieht eine Induktionstherapie – zur frühzeitigen Vorbereitung auf die Transplantation – mit Basiliximab, einem monoklonalen Antikörper gegen den IL-2-Rezeptor (Lüllmann et al., 2008; Ahlenstiehl und Pape, Medizinische Hochschule Hannover, mdl. Mitt. 02/2013), oder sonstigen T-Zell-depletierenden Antikörpern, zum Beispiel Muromonab, vor. Bei Muromonab handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper, der an Membranproteine von T-Zellen bindet und deren Lyse bedingt (Breidenbach und Banas, 2011). Nach der Transplantation setzt sofort die initiale Kombinationsbehandlung ein, wobei in der Regel drei verschiedene Medikamente gegeben werden. Diese immunsuppressive Dreifachtherapie setzt sich aus Calcineurin-Inhibitoren, zum Beispiel Cyclosporin oder Tacrolimus, dem Steroid Prednisolon und dem zytotoxischen Proliferationsinhibitor Mycophenolat zusammen (Breidenbach und Banas, 2011; Ahlenstiehl und Pape, Medizinische Hochschule Hannover, mdl. Mitt. 02/2013). Auch die „mammalian Target of Rapamycin“ (mTOR)-Inhibitoren Sirolimus und Everolimus können eingesetzt werden, deren Wirkprinzip die

Hemmung der Phosphatase mTOR ist (Lüllmann et al., 2008; Ahlenstiehl und Pape, Medizinische Hochschule Hannover, mdl. Mitt. 02/2013). Das Enzym mTOR bewirkt als Teil der Signalkaskade die Aktivierung der Lymphozyten-Vermehrung. Wird das mTOR-Protein aufgrund der Komplexbildung mit Sirolimus oder Everolimus blockiert, so wird die Mitose der Lymphozyten inhibiert.

Unter regelmäßiger Kontrolle der Blutspiegel kann nach etwa drei Monaten auf eine Erhaltungstherapie umgestellt werden. Die Zusammenstellung der Immunsuppressiva im Rahmen dieser konsequent durchzuführenden Dauertherapie ist abhängig von der Art des transplantierten Organs und dem immunologischen Risiko des Patienten (Breidenbach und Banas, 2011; Ahlenstiehl und Pape, Medizinische Hochschule Hannover, mdl. Mitt. 02/2013). Eventuell kann die Dosis der Immunsuppressiva etwas reduziert oder die Kombination der Medikamente umgestellt werden (Ahlenstiehl und Pape, Medizinische Hochschule Hannover, mdl. Mitt. 02/2013).

2.3.1.2 Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin

Cyclosporin A wurde 1976 aus dem Pilz *Tolypocladium inflatum*, irrtümlich zunächst als *Trichoderma polysporum* bezeichnet, isoliert (Dreyfuss et al., 1976). Seine immunsuppressive Wirkung wurde durch Borel et al. entdeckt (Borel et al., 1976). Das zyklische Peptid aus elf zum Teil atypischen Aminosäuren zeigte in Versuchen eine antilymphotische Wirkung und eine Hemmung der humoralen und zellulären Immunantwort (Borel et al., 1976).

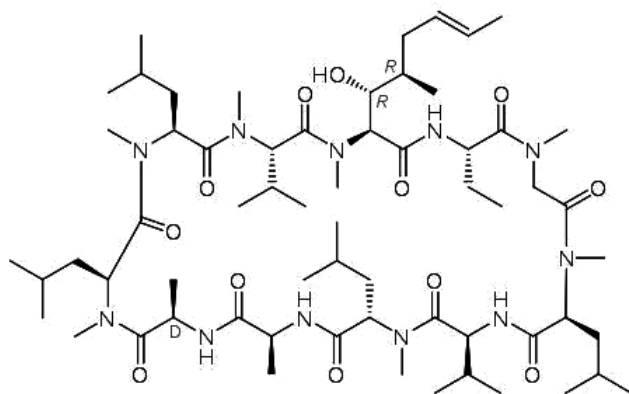


Abb. 12: Cyclosporin A

Zyklisches Peptid und Calcineurin-Inhibitor.

Bestehend aus elf Aminosäureresten, überwiegend Alanin, Leucin und Valin.

(Struktur: vgl. Borel et al., 1976)

Cyclosporin A bewirkt eine Verzögerung der Abstoßung von Hauttransplantaten und eine Rückläufigkeit der Graft-versus-Host-Reaktion (Borel et al., 1976; Dunn et al., 1979). Die Substanz verfügt zudem über eine deutlich T-Zell-spezifische Wirkung (Borel et al., 1977; Gordon und Singer, 1979; Calne et al., 1981).

Ende der 70er Jahre wurde Cyclosporin A in Kombination mit Steroiden zum ersten Mal bei einer Transplantation verwendet (Calne et al., 1979; Calne et al., 1981). In den Folgejahren wurde es als Standardtherapeutikum etabliert, wobei jedoch in diesem Zusammenhang auch die schweren Nebenwirkungen deutlich wurden, die unter einer Behandlung mit Cyclosporin auftreten (Tilney et al., 1984).

Bis heute gehört der Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin A zu den Standardtherapeutika nach Transplantationen (Aktories et al., 2004; Lüllmann et al., 2008; Storb et al., 2010; Breidenbach und Banas, 2011; Ahlenstiehl und Pape, Medizinische Hochschule Hannover, mdl. Mitt. 02/2013). Das Wirkprinzip des Cyclosporin A (CsA) in T-Lymphozyten ist die Bindung an das Immunophilin Cyclophilin A (CyPA), welches normalerweise die Funktion einer Isomerase ausübt und die Protein-Faltung in Zellen unterstützt (Bierer et al., 1993; Marks, 1996). Cyclosporin A hemmt die Rotamase-Aktivität des Enzyms und gleichzeitig bindet der CsA-CyPA-Komplex an die Phosphatase Calcineurin und verhindert die Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors NFAT (Bierer et al., 1993). Dadurch wird die Translokation von NFAT in den Zellkern unterbunden und es kann keine T-Zell-Aktivierung stattfinden (Feske, 2007; Parekh, 2010). Bedingt durch die antilymphotische Effektivität und die suppressive Wirkung auch auf Nicht-Immunzellen (Trevillyan et al., 2001) ergibt sich ein breites Spektrum an Nebenwirkungen, darunter eine erhöhte Infekt- und Tumoranfälligkeit, Nephrotoxizität, Hepatotoxizität und Hypertonie (Breidenbach und Banas, 2011).

2.3.2 Immunmodulation mit CRAC-Blockern

Die durch Cyclosporin A verursachten Nebenwirkungen treten bei einer Dauereinnahme, wie sie nach Transplantationen gefordert ist, verstärkt auf. Sie sind unter anderem darauf zurückzuführen, dass sich eine Calcineurin-Inhibierung in vielen Zelltypen bemerkbar macht (Aramburu et al., 2004). Es wird daher intensiv an der Erforschung von Immunmodulatoren gearbeitet, die speziell mit T-Lymphozyten interagieren und deshalb über ein begrenzteres Nebenwirkungsspektrum verfügen könnten (Trevillyan et al., 2001; Feske, 2007). Da die Calciumdynamik für T-Lymphozyten essentiell ist, werden CRAC-Antagonisten untersucht, deren Ziel die Untereinheit ORAI ist (Putney, 2001; Feske, 2007; Parekh, 2010). Das Einsatzgebiet von T-Zell-spezifischen CRAC-Blockern wäre die immunsuppressive Therapie nach Transplantationen, aber auch die Behandlung von Autoimmunerkrankungen (Feske, 2007).

SKF96365

Einer der ersten experimentell genutzten CRAC-Blocker war die Imidazol-Struktur SKF96365, für die nachgewiesen werden konnte, dass sie selektiv den externen Calcium-Einstrom verhindert und nicht die Freisetzung des Calciums aus dem ER beeinträchtigt (Merritt et al., 1990). Die Substanz ist jedoch als Pharmakon ungeeignet, da SKF96365 neben der Blockade des CRAC auch beträchtliche Auswirkungen auf andere Ionenkanäle zeigt (Singh et al., 2010).

Econazol und 2-APB

Ähnliches gilt für Econazol und 2-Aminoethyldiphenylborat (2-APB), die ebenfalls aufgrund zu ausgeprägter Nebeneffekte nicht klinisch verwendet werden können (Bakowski et al., 2000; Franzius et al., 1994; Parekh, 2010). Der Angriffspunkt des 2-APB liegt auf der extrazellulären Seite des ORAI-Transmembranproteins (Prakriya und Lewis, 2001). Die Wirkung am CRAC kann dosisabhängig sowohl eine aktivierende (bei geringer Konzentration des 2-APB) als auch eine inhibierende (bei hoher Konzentration des 2-APB) sein (Prakriya und Lewis, 2001).

Die bisher genannten Substanzen haben den Nachteil, dass sie nicht selektiv gegen T-Lymphozyten wirken, sondern verschiedene Zelltypen angreifen können (Parekh, 2010). Im Gegensatz dazu werden diverse 3,5-Trifluoromethylpyrazol-Derivate als CRAC-Blocker in Betracht gezogen, da sie eine T-Zell-spezifische Wirkung aufweisen (Trevillyan et al., 2001).

BTP2

Das BTP2 mit der Bezeichnung YM-58483 (Trevillyan et al., 2001; Ishikawa et al., 2003; Zitt et al., 2004) liegt mit einem IC_{50} von 10 nM bei chronischer Exposition deutlich unter den IC_{50} -Werten von SKF96365, Econazol und 2-APB, deren Werte im mikromolaren Bereich liegen (Zitt et al., 2004). Damit beweist BTP2 eine deutlich bessere Effektivität der Hemmung als andere CRAC-Antagonisten. Auf intrazelluläre Calciumspeicher wirkt sich BTP2 nicht aus, die Substanz kann jedoch neben dem CRAC auch den Ionenkanal TRPM4 und andere TRP-Rezeptoren in der Plasmamembran beeinflussen (Takezawa et al., 2006; Parekh, 2010).

Synta 66, Diethylstilbestrol und Carboxyamidotriazol

Synta 66 ist kein Pyrazol, besitzt aber eine ähnliche Struktur wie BTP2 (Parekh, 2010). Aufgrund des relativ hohen IC_{50} ist der antagonistische Effekt am CRAC allerdings als relativ gering zu bewerten. Ein weiterer CRAC-Blocker, das synthetische Diethylstilbestrol, wurde erforscht, kam jedoch aufgrund seiner Interaktion mit Östrogen-Rezeptoren nicht für die weitere klinische Forschung in Frage (Zakharov et al., 2004; Parekh, 2010). Auch die zunächst vielversprechende Substanz Carboxyamidotriazol, die in der Krebsbehandlung in Phase I und II der klinischen Versuche getestet wurde, musste als therapeutisch nutzbarer CRAC-Antagonist verworfen werden, da der Wirkstoff das mitochondriale Membranpotential depolarisiert und sich auf die Phospholipase C auswirkt (Parekh, 2010).

Lanthan und Gadolinum

Weitere Substanzen, die bei *in vitro* Versuchen erforscht wurden, sind die dreiwertigen Lanthanoide Lanthan La^{3+} und Gadolinum Ga^{3+} , die den CRAC bereits mit einem niedrigen IC_{50} -Wert effektiv hemmen, ohne dabei in die Zelle einzudringen (Aussel et al., 1996; Hou et al., 2012). Kritisch bezüglich einer klinischen Nutzung stellt sich allerdings die inhibierende Interaktion des La^{3+} mit dem T-Zell-Co-Rezeptor CD25 und mit dem IL-2-Rezeptor dar (Aussel et al., 1996).

Problematisch für die Entwicklung therapeutisch nutzbarer CRAC-Blocker ist die Tatsache, dass die meisten der bisher genannten Antagonisten die jeweiligen ORAI-Proteine, aus denen sich der CRAC zusammensetzt, in unterschiedlicher Art und Weise beeinflussen können: Zum Beispiel hat 2-APB eine stark aktivierende Wirkung auf die CRAC-Untereinheit ORAI3, bezüglich des ORAI1 zeigt die Substanz jedoch lediglich einen abgeschwächten Effekt (DeHaven et al., 2008; Parekh, 2010). Darüber hinaus scheint 2-APB auch die Oligomerisierung der STIM1-Moleküle in der Membran des ER zu beeinflussen (DeHaven et al., 2008).

Mit vielen der bisher erforschten CRAC-Blocker werden auf verschiedenen Ebenen in der Calcium-Signalkette gleichzeitig unterschiedliche Auswirkungen erzielt, wodurch die Eingrenzung auf einen gewünschten Zielort mit der Hemmung einzelner Proteine oder CRAC-Untereinheiten erschwert wird (Parekh, 2010). Dies macht die bisher getesteten CRAC-Antagonisten pharmakologisch schwer kontrollierbar. So finden zwar intensive Forschungen an CRAC-Blockern statt, dennoch verfügt derzeit keine der Substanzen über eine klinische Zulassung (Feske, 2007; Parekh, 2010).

2.3.3 CRAC-Blocker-Tests mit einem pharmakologischen Modell

Mit einem pharmakologischen Calciumdynamik-Modell könnten Substanzen, die *in vitro* bereits als potentielle CRAC-Blocker aufgefallen sind, auf ihre spezifische Wirkung und ihre Bindungsmodalitäten am CRAC überprüft werden. Antagonistische Nebeneffekte auf andere Calciumkanäle und -pumpen in der T-Zelle könnten im Modell beobachtet und analysiert werden. Die Beeinflussung der Calciumdynamik, und damit des Aktivierungszustands des T-Lymphozyten, ließe sich *in silico* quantitativ erfassen. Dadurch könnten Studien zur Pharmakodynamik der Testsubstanzen, zunächst auf molekularer und zellulärer Ebene, erfolgen. Dieser pharmakologische Modellansatz ließe sich dann in einem weiteren Schritt auf die Ebene von Geweben und Organen erweitern.

Mit einem pharmakologischen Calciumdynamik-Modell – aufbauend auf dem im Rahmen dieser Dissertation vorgestellten Basis-Modell – würde sich die Möglichkeit bieten, in Ergänzung zu den *in vitro*-Forschungen an CRAC-Antagonisten, pharmakologische *in silico* Studien durchzuführen. Damit könnte die Entwicklung neuer Immunsuppressiva, zum Beispiel im Bereich der Transplantationsmedizin, unterstützt werden.

VII LITERATURVERZEICHNIS

Abramowicz, D., Schandene, L., Goldman, M., Crusiaux, A., Vereerstraeten, P., De Pauw, L., Wybran, J., Kinnaert, P., Dupont, E. & Toussaint, C. (1989) Release of tumor necrosis factor, interleukin-2, and gamma-interferon in serum after injection of OKT3 monoclonal antibody in kidney transplant recipients. *Transplantation* 47:4, 606-608.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (1994) *The molecular Biology of the Cell*. 3rd ed. Garland, New York.

Albright, F. & Sulkowitch, H.W. (1938) The effect of vitamin D on calcium and phosphorus metabolism; studies on four patients. *J. Clin. Invest.* 17:3, 305-315.

Albritton, N.L., Meyer, T. & Stryer, L. (1992) Range of Messenger Action of Calcium Ion and Inositol 1,4,5-Trisphosphate. *Science* 258: 9-12.

Aktories, K. (Hrsg.), Förstermann, U. (Hrsg.), Hofmann, F.B. (Hrsg.) & Starke, K. (Hrsg.) (2004) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 9. Auflage. Urban & Fischer Verlag, Elsevier GmbH, München.

Aramburu, J., Heitman, J. & Crabtree, G.R. (2004) Calcineurin: a central controller of signalling in eukaryotes. *EMBO reports* 5:4, 343-348.

Arrol, H.P., Church, L.D., Bacon, P.A. & Young, S.P. (2008) Intracellular calcium signalling patterns reflect the differentiation status of human T cells. *Clin. Exp. Immunol.* 153:1, 86-95.

Aussel, C., Marhaba, R., Pelassy, C. & Breittmayer, J-P. (1996) Submicromolar La^{3+} concentrations block the calcium release-activated channel, and impair CD69 and CD25 expression in CD3- or thapsigargin-activated Jurkat cells. *Biochem. J.* 313: 909-913.

Avni, O. & Rao, A. (2000) T cell differentiation: a mechanistic view. *Curr. Opin. Immunol.* 12:6, 654-659.

Babsky, E.B. & Minajev, P.F. (1946) Combined Action upon Muscle of Adenosine Triphosphate, Acetylcholine and Potassium, Calcium and Magnesium Ions. *Nature* 158: 238. 158-238.

Baksh, S. & Michalak, M. (1991) Expression of calreticulin in *Escherichia coli* and identification of its Ca^{2+} binding domains. *J. Biol. Chem.* 266:32, 21458-21465.

- Bakowski, D. & Parekh, A.B. (2000) Voltage-dependent conductance changes in the store-operated Ca^{2+} current I_{CRAC} in rat basophilic leukaemia cells. *J. Physiol.* 529:2, 295-306.
- Bakowski, D., Glitsch, M.D. & Parekh, A.B. (2001) An examination of the secretion-like coupling model for the activation of the Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} current I_{CRAC} in RBL-1 cells. *J. Physiol.* 532:1, 55-71.
- Balasubramanyam, M., Rohowsky-Kochan, C., Reeves, J.P. & Gardner, J.P. (1994) $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange-mediated calcium entry in human lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 94:5, 2002-2008.
- Bhakta, N.R., Oh, D.Y. & Lewis, R.S. (2005) Calcium oscillations regulated thymocyte motility during positive selection in the three-dimensional thymic environment. *Nat. Immunol.* 6:2, 143-151.
- Bautista, D.M., Hoth, M. & Lewis, R.S. (2002) Enhancement of calcium signalling dynamics and stability by delayed modulation of the plasma-membrane calcium-ATPase in human T cells. *J. Physiol.* 541:3, 877-894.
- Bautista, D.M. & Lewis, R.S. (2004) Modulation of plasma membrane calcium-ATPase activity by local calcium microdomains near CRAC channels in human T cells. *J. Physiol.* 556:3, 805-817.
- Berg, I., Potter, B.V., Mayr, G.W., Guse, A.H. (2000) Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP⁺) is an essential regulator of T-lymphocyte Ca^{2+} -signaling. *J. Cell Biol.* 150:3, 581-588.
- Bergling, S., Dolmetsch, R., Lewis, R.S. & Keizer, J. (1998) A fluorometric method for estimating the calcium content of internal stores. *Cell Calcium* 23:4, 251-259.
- Berridge, M.J. & Irvine, R.F. (1984) Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312: 315-321.
- Berridge, M.J. & Galione, A. (1988) Cytosolic calcium oscillators. *FASEB J.* 2: 3074-3082.
- Berridge, M.J. (1993) A tale of two messengers. *Nature* 365: 388-389.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D. & Lipp, P. (1998) Calcium – a life and death signal. *Nature* 395: 645-648.
- Berridge, M.J., Lipp, P. & Bootman, M.D. (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1: 11-21.

- Berridge, M.J., Bootman, M.D. & Roderick, H.L. (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4:7, 517-529.
- Bezprozvanny, I., Watras, J., Ehrlich, B.E. (1991) Bell-shaped calcium-response curves of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ - and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature* 351: 751-754.
- Bierer, B.E., Holländer, G., Fruman, D. & Burakoff, S.J. (1993) Cyclosporin A and FK506: molecular mechanisms of immunosuppression and probes for transplantation biology. *Curr. Opin. Immunol.* 5: 763-773.
- Blaustein, M.P. & Lederer, W.J. (1999) Sodium/Calcium Exchange: Its Physiological Implications. *Physiol. Rev.* 79:3, 763-854.
- Borel, J.F., Feurer, C., Gubler, H.U. & Stähelin, H. (1976) Biological Effects of Cyclosporin A: A New Antilymphotic Agent. *Agents and Actions* 6:4.
- Borel, J.F., Feurer, C., Magnée, C. & Stähelin, H. (1977) Effects of the new anti-lymphocytic peptide cyclosporin A in animals. *Immunology* 32: 1017-1025.
- Braun, F.-J., Broad, L.M., Armstrong, D.L. & Putney, J. (2001) Stable Activation of Single Ca^{2+} Release-activated Ca^{2+} Channels in Divalent Cation-free Solutions. *J. Biol. Chem.* 276: 1063-1070.
- Breidenbach, T. (Hrsg.) & Banas, B. (Hrsg.) (2011) Organspende und Transplantationsmedizin. 1. Auflage. Börm Bruckmeier Verlag GmbH, Grünwald.
- Broere, F., Apasov, S.G., Sitkovsky, M.V. & van Eden, W. (2011) T cell subsets and T cell-mediated immunity. *Principles of Immunopharmacology*. 3rd ed. Springer Basel AG, Basel.
- Burnet, F.M. (1960) Immunological recognition of self. *Science* 133:3449, 307-311.
- Cahalan, M.D., Chandy, K.G., DeCoursey, T.E. & Gupta, S. (1985) A voltage-gated potassium channel in human T lymphocytes. *J. Physiol.* 358: 197-237.
- Cahalan, M.D. & Chandy, K.G. (2009) The functional network of ion channels in T lymphocytes. *Immunol. Rev.* 231:1, 59-87.
- Calne, R.Y., Rolles, K., White, D.J., Thiru, S., Evans, D.B., McMaster, P., Dunn, D.C., Craddock, G.N., Henderson, R.G., Aziz, S. & Lewis, P. (1979) Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs: 32 kidneys, 2 pancreases, and 2 livers. *Lancet* 2:8151, 1033-1036.

- Calne, R.Y., Rolles, K., White, D.J., Thiru, S., Evans, D.B., Henderson, R., Hamilton, D.L., Boone, N., McMaster, P., Gibby, O. & Williams, R. (1981) Cyclosporin A in clinical organ grafting. *Transplant. Proc.* 13:1, 349-358.
- Cai, X. (2008) Unicellular Ca^{2+} Signaling 'Toolkit' at the Origin of Metazoa. *Mol. Biol. Evol.* 25:7, 1367-1361.
- Cameron, D.A., Paschall, H.A. & Robinson, R.A. (1967) Changes in the fine structure of bone cells after the administration of parathyroid extract. *J. Cell Biol.* 33:1, 1-14.
- Caride, A.J., Filoteo, A.G., Penheiter, A.R., Paszty, K., Enyedi, A. & Penniston, J.T. (2001a) Delayed activation of the plasma membrane calcium pump by a sudden increase in Ca^{2+} : fast pumps reside in fast cells. *Cell Calcium* 30:1, 49-57.
- Caride, A.J., Penheiter, A.R., Filoteo, A.G., Bajzer, Z., Enyedis, A. & Penniston, J.T. (2001b) The Plasma Membrane Calcium Pump Displays Memory of Past Calcium Spikes. *J.Biol.Chem.* 276:43, 39797-39804.
- Case, R.M., Eisner, D., Gurney, A., Jones, O., Muallem, S. & Verkhatsky (2007) Evolution of calcium homeostasis: From birth of the first cell to an omnipresent signalling system. *Cell Calcium* 42: 345-350.
- Chandrasekera, P.C., Kargacin, M.E., Deans, J.P. & Lytton, J. (2009) Determination of apparent calcium affinity for endogenously expressed human sarco(endo)plasmic reticulum calcium-ATPase isoform SERCA3. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 296:5, 1105-1114.
- Chapman, J.B., Johnson, E.A. & Kootsey, J.M. (1983) Electrical and Biochemical Properties of an Enzyme Model of the Sodium Pump. *J. Membrane Biol.* 47: 139-153.
- Chen, X.F., Li, C.X., Wang, P.Y., Li, M. & Wang, W.C. (2008) Dynamic simulation of the effect of calcium-release activated calcium channel on cytoplasmic Ca^{2+} oscillation. *Biophys. Chem.* 136:2-3, 87-95.
- Cheng, H. & Lederer, W.J. (2008) Calcium Sparks. *Physiol. Rev.* 88: 1491-1545.
- Clapham, D.E. (2007) Calcium signaling. *Cell* 131:6, 1047-1058.
- Collip, J. (1925) Clinical Use of the Parathyroid Hormone. *Can. Med Assoc. J.* 15:11, 1158.
- Copp, D.H. & Cheney, Y.B. (1962) Calcitonin – a hormone from the parathyroid which lowers the calcium-level of the blood. *Nature* 193: 381-382.

- Copp, D.H. (1964) Parathyroids, Calcitonin and control of plasma calcium. *Recent Prog. Horm. Res.* 20: 59-88.
- Corthay, A (2009) How do Regulatory T Cells Work? *Scand. J. Immunol.* 70: 326-336.
- Cox, J.A., Comte, M. & Stein, E.A. (1982) Activation of human erythrocyte Ca^{2+} -dependent Mg^{2+} -activated ATPase by calmodulin and calcium: quantitative analysis. *PNAS* 79:14, 4265-4269.
- Crabtree, G.R. (1989) Contingent Genetic Regulatory Events in T lymphocyte Activation. *Science* 243: 355-361.
- Dadsetan, S., Zakharova, L., Molinski, T.F., Fomina, A.F. (2008) Store-operated Ca^{2+} Influx Causes Ca^{2+} Release from the Intracellular Ca^{2+} Channels That Is Required for T Cell Activation. *J. Biol. Chem.* 283:18, 12512-12519.
- Dammermann, W. & Guse, A.H. (2005) Functional ryanodine receptor expression is required for NAADP-mediated local Ca^{2+} signaling in T-lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 280: 21394-21399.
- Da Silva, C.P. & Guse, A.H. (2000) Intracellular Ca^{2+} release mechanisms: multiple pathways having multiple functions within the same cell type? *Biochim. Biophys. Acta* 1498:2-3, 122-133.
- Decoursey, T.E., Chandy, K.G., Gupta, S. & Cahalan, M.D. (1987) Mitogen Induction of ion Channels in Murine T Lymphocytes. *J. gen. Physiol.* 89:3, 405-420.
- DeHaven, W., Smyth, J.T., Boyles, R.R. Bird, G.S. & Putney, J.W. (2008) Complex actions of 2-aminoethyldiphenyl borate on store-operated calcium entry. *J. Biol. Chem.* 283:28, 19265-19273.
- Derler, I., Schindl, R., Fritsch, R., Heftberger, P., Riedl, M.C., Begg, M., House, D. & Romanin, C. (2013) The action of selective CRAC channel blockers is affected by the Orai pore geometry. *Cell Calcium* 53: 139-151.
- Delon, J., Bercovici, N., Liblau, R. & Trautmann, A. (1998) Imaging antigen recognition by naïve CD4^+ T cells: compulsory cytoskeletal alterations for the triggering of an intracellular calcium response. *Europ. J. Immunol.* 28:2, 716-729.
- De Young, G.W. & Keizer, J. (1992) A single-pool inositol 1,4,5-trisphosphate-receptor-based model for agonist-stimulated oscillations in Ca^{2+} concentration. *PNAS* 89: 9895-9899.

- Dobretsov, M. & Stimers, J.R. (1996) Characterization of the Na/K pump current in N20.1 oligodendrocytes. *Brain. Res.* 724:1, 103-111.
- Dolmetsch, R.E. & Lewis, R.S. (1994) Signaling between Intracellular Ca^{2+} Stores and Depletion-activated Ca^{2+} Channels Generated $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Oscillations in T Lymphocytes. 103: 365-388.
- Dolmetsch, R.E., Lewis, R.S., Goodnow, C.C. & Healy, J.I. (1997) Differential activation of transcription factors induced by Ca^{2+} response and duration. *Nature* 386: 855-858.
- Donnadieu, E. & Trautmann, A. (1993) Is there a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in Macrophages and in Lymphocytes? *Pflugers. Arch.* 424:5-6, 448-455.
- Dreyfuss, M., Härrli, E., Hofmann, H., Kobel, H., Pache, W. & Tscherter, H. (1976) Cyclosporin A and C. New Metabolites from *Trichoderma polysporum* (Link ex Pers.) Rifai. *Eur. J. Appl. Microbiol.* 3, 125-133.
- Duggin, G.G., Lyneham, R.C., Dale, N.E., Evans, R.A. & Tiller, D.J. (1974) Calcium balance in pregnancy. *The Lancet.* 304:7886, 926-927.
- Dunn, D.C., White, D.J., Herbertson, B.M. & Wade, J. (1979) Prolongation of kidney survival during and after cyclosporin A therapy. *Transplantation* 27:5, 359-361.
- Ebashi, S., Ebashi, F. & Kodama, A. (1967) Troponin as the Ca^{2+} -receptive Protein in the Contractile System. *J. Biochem.* 62:1, 137-138.
- Elwess, N.L., Filoteo, A.G., Enyedi, A. & Penniston, J.T. (1997) Plasma Membrane Ca^{2+} Pump Isoforms 2a and 2b Are Unusually Responsive to Calmodulin and Ca^{2+} . *J. Biol. Chem.* 272:29, 17981-17986.
- Endo, M. (2006) Calcium Ion as a Second Messenger With Special Reference to Excitation-Contraction Coupling. *J. Pharmacol. Sci.* 100: 519-524. *J. Biol. Chem.* 272:29, 17981-17986.
- Engel, M., Sidwell, T., Vasanthakumar, A., Grigoriadis, G. & Banerjee, A. (2013) Thymic regulatory T cell development: role of signalling pathways and transcription factors. *Clin. Dev. Immunol.* 2013:617595, 1-8.
- Feldberg, W. & Gaddum, J.H. (1934) The chemical transmitter at synapses in a sympathetic ganglion. *J. Physiol.* 81:3, 305-319.

- Feske, S., Müller, J.M., Graf, D., Kroczeck, R.A., Dräger, R., Niemeyer, C., Baeuerle, P.A., Peter, H.-H. & Schlesier, M. (1996) Severe combined immunodeficiency due to defective binding of the nuclear factor of activated T cells in T lymphocytes of two male siblings. *Eur. J. Immunol.* 26: 2119-2126.
- Feske, S., Prakriya, M., Rao, A. & Lewis, R.S. (2005) A severe defect in CRAC Ca^{2+} channel activation and altered K^+ channel gating in T cells from immunodeficient patients. *J. Exp. Biol.* 202:5, 651-662.
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S.-H., Tanasa, B., Hogan, P.G., Lewis, R.S., Daly, M. & Rao, A. (2006) A mutation in *Orai1* causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 441: 7090, 179-185.
- Feske, S. (2007) Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 7:9, 690-702. *J. Exp. Med.* 202:5, 651-662.
- Feske, S. (2011) Immunodeficiency due to defects in store-operated calcium entry. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1238: 74-90.
- Feske, S., Skolnik, E.Y. & Prakriya, M. (2012) Ion channels and transporters in lymphocyte function and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 12:7, 532-547.
- Finlay, B.B. & McFadden, G. (2006) Anti-Immunology: Evasion of the Host Immune System by Bacterial and Viral Pathogens. *Cell* 124:4, 767-782.
- Fomina, A.F., Fanger, C.M., Kozak, J.A. & Cahalan, M.D. (2000) Single Channel Properties and Regulated Expression of Ca^{2+} Release-Activated Ca^{2+} (CRAC) Channels in Human T Cells. *J. Cell Biol.* 150: 1435-1444.
- Forge, V., Mintz, E. & Guillain, F. (1993) Ca^{2+} binding to sarcoplasmic reticulum ATPase revisited. II. Equilibrium and kinetic evidence for a two-route mechanism. *J. Biol. Chem.* 268:15, 10961-10968.
- Foskett, J.K., White, C., Cheung, K.-H. & Mak, D.-O.D. (2007) Inositol Trisphosphate Receptor Ca^{2+} Release Channels. *Physiol. Rev.* 87: 593-658.
- Franzius, D., Hoth, M. & Penner, R. (1994) Non-specific effects of calcium entry antagonists in mast cells. *Pflügers Arch.* 428:5-6, 433-438.
- Fridlyand, L.E., Tamarina, N. & Philipson, L.H. (2003) Modeling of Ca^{2+} flux in pancreatic beta-cells: role of the plasma membrane and intracellular stores. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285:1, E138-154.

- Gangola, P. & Rosen B.P. (1987) Characterization of a P-type Ca^{2+} -ATPase from *Flavobacterium odoratum*. J. Biol. Chem. 267: 15923-15931.
- Ganguly, D., Haak, S., Sisirak, V. & Reizis, B. (2013) The role of dendritic cells in autoimmunity. Nat. Rev. Immunol. 13:8, 566-577.
- García, M.A.A., Yebra, B.G., Flores, A.L.L. & Guerra, E.G. (2012) The Major Histocompatibility Complex in Transplantation. J. Transplant. 2012:84214, 1-8.
- Gardner, P. (1990) Patch clamp studies of lymphocyte activation. Annu. Rev. Immunol. 8: 231-252.
- Gauld, S.B., Benschop, R.J., Merrell, K.T. & Cambier, J.C. (2005) Maintenance of B cell anergy requires constant antigen receptor occupancy and signaling. Nat. Immunol. 6:11, 1160-1167.
- Gentet, L.J., Stuart, G.J., Clements, J.D. (2000) Direct measurement of specific membrane capacitance in neurons. Biophys. J. 79:1, 314-320.
- Goldsby R.A., Kindt T.J., Osborne B.A. & Kuby J. (2003) Immunology. 5th ed. W.H. Freeman and Company, New York.
- Goodbourn, S., Didcock, L. & Randall, R.E. (2000) Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures. J. Gen. Virol. 81: 2341-2364.
- Gordon, M.Y. & Singer, J.W. (1979) Selective effects of cyclosporin A on colony-forming lymphoid and myeloid cells in man. Nature 279:5712, 433-434.
- Grafton, G. & Thwaite, L. (2001) Calcium channels in lymphocytes. Immunology 104:2, 119-126.
- Graupner, M., Eler, F. & Meyer-Hermann, M. (2005) A theory of plasma membrane calcium pump stimulation and activity. J. Biol. Phys. 31:2, 183-206.
- Gregory, R.B. & Barritt, G.J. (2003) Evidence that Ca^{2+} -release-activated Ca^{2+} channels in rat hepatocytes are required for the maintenance of hormone-induced Ca^{2+} oscillations. Biochem. J. 370: 695-702.
- Grissmer, S., Nguyen, A.N. & Cahalan, M.D. (1993) Calcium-activated Potassium Channels in Resting and Activated Human T Lymphocytes. J. Gen. Physiol. 102:4, 601-630.

- Guse, A.H., Roth, E. & Emmrich, F. (1992) D-myo-inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate releases Ca^{2+} from crude microsomes and enriched vesicular plasma membranes, but not from intracellular stores of permeabilized T-lymphocytes and monocytes. *Biochem. J.* 288:2, 489-495.
- Guse, A.H., da Silva, C.P., Berg, I., Skapenko, A.L., Weber, K., Heyer, P., Hohenegger, M., Ashamu, G.A., Schulze-Koops, H., Potter, B.V. & Mayr, G.W. (1999) Regulation of calcium signalling in T lymphocytes by the second messenger cyclic ADP-ribose. *Nature* 398: 70-73.
- Guse, A.H. (2009) Second messenger signaling: multiple receptors for NAADP. *Curr. Biol.* 19: 521-523.
- Guse, A.H. (2012) Linking NAADP to ion channel activity: a unifying hypothesis. *Sci. Signal* 5:221,pe18.
- Göpel, S., Zhang, Q., Eliasson, L., Ma, X.S., Galvanovskis, J., Kanno, T., Salehi, A. & Rorsman, P. (2004) Capacitance measurements of exocytosis in mouse pancreatic alpha-, beta- and delta-cells within intact islets of Langerhans. *J. Physiol.* 556: 711-726.
- Gwack, Y., Srikanth, S., Oh-hora, M., Hogan, P.G., Lamperti, E.D., Yamashita, M., Gelinas, C., Neems, D.S., Sasaki, Y., Feske, S., Prakriya, M., Rajewsky, K. & Rao, A. (2008) Hair Loss and Defective T- and B-Cell Function in Mice Lacking ORAI1. *Mol. Cell. Biol.* 28:17, 5209-5222.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, F.J. (1981) Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches. *Pflügers Arch.* 391: 85-100.
- Harris, L & Innes, J. (1930) The mode of action of vitamin D. Studies on hypervitaminosis D. The influence of the calcium-phosphate intake. *Biochem. J.* 25:1, 367-390.
- Harvey, A.M. & MacIntosh F.C. (1940) Calcium and synaptic transmission in a sympathetic ganglion. *J. Physiol.* 97: 408-416.
- Hazari, M.A.H., Arifuddin, M.S., Muzzakar, S. & Reddy, V.D. (2012) Serum Calcium Level in Hypertension. *N. Am. J. Med. Sci.* 4:11, 569-572.
- Hess, S.D., Oortgiesen, M. & Cahaln, M.D. (1993) Calcium Oscillations in Human T and Natural Killer Cells Depend upon Membrane Potential and Calcium Influx. *J. Immunol.* 150:7, 2620-2633.

- Hilgard, P. (1973) Experimental hypercalcaemia and whole blood clotting. *J. Clin. Path.* 26: 616-619.
- Hille, B. (1992) *Ionic Channels of Excitable Membranes*. 2nd ed. Sinauer Associates Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts.
- Hodgkin, A.L. & Huxley, A.F. (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* 117:4, 500-544.
- Hogan, P.G., Chen, L., Nardone, J. & Rao, A. (2003) Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* 17: 2205-2232.
- Hohenegger, M., Suko, J., Gscheidlinger, R., Drobny, H. & Zidar, A. (2002) Nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate activates the skeletal muscle ryanodine receptor. *Biochem. J.* 367:2, 423-431.
- Horn, F., Moc, I., Schneider, N., Grillhösl, C., Berghold, S. & Lindenmeier, G. (2005) *Biochemie des Menschen*. 3. Auflage. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart.
- Hoth, M. & Penner, R. (1993) Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *J. Physiol.* 465: 359-386.
- Hoth, M., Button, D.C. & Lewis, R.S. (2000) Mitochondrial control of calcium-channel gating: A mechanism for sustained signaling and transcriptional activation in T Lymphocytes. *PNAS* 97:19, 10607-10612.
- Hou, X., Pedi, L., Diver, M.M. & Long, S.B. (2012) Crystal structure of the calcium release-activated calcium channel Orai. *Science* 338:6112, 1308-1313.
- Huang, C.Y., Chau, V., Chock, P.B., Wang, J.H. & Sharma, R.K. (1981) Mechanism of activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase: Requirement of the binding of four Ca^{2+} to calmodulin for activation. *PNAS* 78:2, 871-874.
- Imboden, J.B., Stobo, J.D. (1985) Transmembrane signalling by the T cell antigen receptor. *J. Exp. Med.* 161: 446-456.
- Ishida, Y. & Chused, T.M. (1993) Lack of Voltage Sensitive Potassium Channels and Generation of Membrane Potential by Sodium Potassium ATPase in Murine T Lymphocytes. *J. Immunol.* 151: 610-620.
- Ishikawa, J., Ohga, K., Yoshino, T., Takezawa, R., Ichikawa, A., Kubota, H. & Yamada, T. (2003) A pyrazole derivative, YM-58483, potently inhibits store-operated sustained Ca^{2+} influx and IL-2 production in T lymphocytes. *J. Immunol.* 170:9, 4441-4449.

- Ionescu, L., Cheung, K.H., Vais, H., Mak, D.-O.D., White, C. & Foskett, J.K. (2006) Graded recruitment and inactivation of single InsP_3 receptor Ca^{2+} -release channels: implications for quartal Ca^{2+} release. *J. Physiol.* 573:3, 645-662.
- Jaffe, H.L., Bodansky, A. & Chandler, J.P. (1932) Ammonium chloride decalcification, as modified by calcium intake: The relation between generalized osteoporosis and ostitis fibrosa. *J. Exp. Med.* 56:7, 823-834.
- Juhaszova, M., Church, P., Blaustein, M.P. & Stanley, E.F. (2000) Location of calcium transporters at presynaptic terminals. *Eur. J. Neurosci.* 12: 839-846.
- Kakiuchi, S., Yasuda, S., Yamazaki, R., Teshima, Y., Kanda, K., Kakiuchi, R. & Sobue, K. (1982) Quantitative determinations of calmodulin in the supernatant and particulate fractions of mammalian tissues. *J. Biochem.* 92:4, 1041-1048.
- Kazmierczak, J., Kempe, S. & Kremer, B. (2013) Calcium in the Early Evolution of living Systems: A Biohistorical Approach. *Curr. Org. Chem.* 17: 1738-1750.
- Khailaie, S., Bahrami, F., Janahmadi, M., Milanez-Almeida, P., Huehn, J. & Meyer-Hermann, M. (2013) A mathematical model of immune activation with a unified self-nonsel concept. *Front. Immunol.* 4:474, 1-19.
- Kelly, R.P., Sutton, R., Ashcroft, F.M. (1991) Voltage-activated calcium and potassium currents in human pancreatic β -cells. *J. Physiol.* 443: 175-192.
- Kleemann, C. & Bernstein, D. (1961) Chronic Renal Failure. Its Effect on Calcium, Phosphorus and Osseous Metabolism; A Unified Approach. *J. California Med. Assoc.* 94:6, 335-338.
- Kobayashi, S.D., Voyich, J.M., Burlak, C. & DeLeo, F.R. (2005) Neutrophils in the innate immune response. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 53: 505-517.
- Kono, M., Takagi, Y., Kawauchi, S., Wada, A., Morikawa, T & Funakoshi, K. (2013) Non-activated T and B lymphocytes become morphologically distinguishable after detergent treatment. *Cytometry A.* 83:4, 396-402.
- Koolman, J. & Röhm, K.-H. (2003) Taschenatlas der Biochemie. 3. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Kowalewski, J.M., Uhlén, P., Kitano, H. & Brismar, H. (2006) Modeling the impact of store-operated Ca^{2+} entry on intracellular Ca^{2+} oscillations. *Math. Biosci.* 204: 232-249.

- Kozak, J.A., Kerschbaum, H.H. & Cahalan, M.D. (2002) Distinct Properties of CRAC and MIC Channels in RBL Cells. *J. Gen. Physiol.* 120: 221-235.
- Kruskal, B.A. & Maxfield, F.R. (1987) Cytosolic free Calcium Increases before and Oscillates during Frustrated Phagocytosis in Macrophages. *J. Cell Biol.* 105:6, 2685-2693.
- Kumbala, D. & Zhang, R. (2013) Essential concept of transplant immunology for clinical practice. *World J. Transplant.* 3:4, 113-118.
- Kunerth, S., Langhorst, M.F., Schwarzmann, N., Gu, X., Huang, L., Yang, Z., Zhang, L., Mills, S.J., Zhang, L.H., Potter, B.V. & Guse, A.H. (2004) Amplification and propagation of pacemaker Ca^{2+} signals by cyclic ADP-ribose and the type 3 ryanodine receptor in T cells. *J. Cell. Sci.* 117: 2141-2149.
- Kupfer, A., Swain, S.L., Janeway, C.A. & Singer, S.J. (1986) The specific direct interaction of helper T cells and antigen-presenting B cells. *PNAS* 83:16, 6080-6083.
- Ladenburger, E-M., Korn, I., Kasielke, N., Wassmer, T. & Plattner, H. (2006) An $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ receptor in *Paramecium* is associated with the osmoregulatory system. *J. Cell Sci.* 119: 3705-3717.
- Ladenburger, E-M. & Plattner, H. (2011) Calcium-Release Channels in *Paramecium*. Genomic Expansion, Differential Positioning and Partial Transcriptional Elimination. *PLoS One* 6:11, 1-23.
- Launay, S., Bobe, R., Lacabartz-Porret, C., Bredoux, R., Kovács, T., Enouf, J. & Papp, B. (1997) Modulation of endoplasmic reticulum calcium pump expression during T lymphocyte activation. *J. Biol. Chem.* 272:16, 10746-10750.
- Launay, P., Fleig, A., Perraud, A.-L., Scharenberg, A.M., Penner, R. & Kinet, J.-P. (2002) TRPM4 Is a Ca^{2+} -Activated Nonselective Cation Channel Mediating Cell Membrane Depolarization. *Cell* 109: 397-407.
- Launay, P., Cheng, H., Srivatsan, S., Penner, R., Fleig, A. & Kinet, J.-P. (2004) TRPM4 Regulates Calcium Oscillations After T Cell Activation. *Science* 306:5700, 1374-1377.
- Le Deist, F., Hivroz, C., Partiseti, M., Thomas, C., Buc, H.A., Oleastro, M., Belohradsky, B., Choquet, D. & Fischer, A. (1995) A primary T-cell immunodeficiency associated with defective transmembrane calcium influx. *Blood* 85: 1053-1062.
- Lee, S.C., Levy, D.I. & Deutsch, C. (1992) Diverse K^+ Channels in primary Human T Lymphocytes. *J. Gen. Physiol.* 99:5, 771-793.

- Leitenberg, D. & Bottomly, K. (1999) Regulation of naïve T cell differentiation by varying the potency of TCR signal transduction. *Semin. Immunol.* 11:4, 283-292.
- Lewis, R.S. & Cahalan, M.D. (1989) Mitogen-induced oscillations of cytosolic Ca^{2+} and transmembrane Ca^{2+} current in human leukemic T cells. *Cell Regul.* 1: 99-112.
- Lewis, R.S. (2001) Calcium Signaling Mechanisms in T Lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 19: 497-521.
- Lewis, R.S. (2003) Calcium oscillations in T-cells: mechanisms and consequences for gene expression. *Biochem. Soc. Trans.* 5: 925-929.
- Lewis, R.S. (2007) The molecular choreography of a store-operated calcium channel. *Nature* 446:7133, 284-287.
- Levy, D.E., Marié, I.J., Durbin, J.E. (2011) Induction and function of type I and III interferon in response to viral infection. *Curr. Opin. Virol.* 1:6, 476-486.
- Li, Z., Liu, L., Deng, Y., Ji, W., Du, W., Xu, P., Chen, L. & Xu, T. (2011) Graded activation of CRAC channel by binding of different numbers of STIM1 to Orai1 subunits. *Cell Res.* 21:2, 305-315.
- Liou, J., Kim, M.L., Heo, D.W., Jones, J.T., Myers, J.W., Ferrell, J.E. & Meyer, T. (2005) STIM Is a Ca^{2+} Sensor Essential for Ca^{2+} -Store-Depletion-Triggered Ca^{2+} Influx. *Curr. Biol.* 15: 1235-1241.
- Lioudyno, M.I., Kozak, J.A., Penna, A., Safrina, O., Zhang, S.L., Sen, D., Roos, J., Stauderman, K.A. & Cahalan, M.D. (2008) Orai1 and STIM1 move to the immunological synapse and are up-regulated during T cell activation. *PNAS* 105:6, 2011-2016.
- Locke, F.S. (1894) Note on Oxalates and Muscle-Rigor. *J. Physiol.* 17:3-4, 293-295.
- Luik, R.M., Wu, M.M., Buchanan, J. & Lewis, R.S. (2006) The elementary unit of store-operated Ca^{2+} entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions. *J. Cell Biol.* 174:6, 815-825.
- Luik, R.M., Wang, B., Prakriya, M., Wu, M.M. & Lewis, R.S. (2008) Oligomerization of STIM1 couples ER calcium depletion to CRAC channel activation. *Nature* 454:7203, 538-542.
- Lytton, J., Westlin, M., Burk, S.E., Shull, G.E. & MacLennan, D.H. (1992) Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *J. Biol. Chem.* 267:20, 14483-14489.

- Lyubchenko, T.A., Wurth, G.A. & Zweifach, A. (2001) Role of calcium influx in cytotoxic T lymphocyte lytic granule exocytosis during target cell killing. *Immunity* 15:5, 847-859.
- Lüllmann, H., Mohr, K. & Hein, L. (2008) Taschenatlas Pharmakologie. 6. Auflage. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart.
- Macian, F. (2005) NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat. Rev. Immunol.* 5:6, 472-484.
- Maixent, J.M. & Berrebi-Betrand, I. (1993) Turnover rates of the canine cardiac Na, K-ATPases. *FEBS Lett.* 330:3, 297-301.
- Mak, D.-O. D. & Foskett, J.K. (1997) Single-channel kinetics, inactivation, and spatial distribution of inositol trisphosphate (IP₃) receptors in xenopus oocyte nucleus. *J. Gen. Physiol.* 109: 571-587.
- Mak, D.-O. D., McBride, S. & Foskett, J.K. (1998) Inositol 1,4,5-tris-phosphate activation of inositol tris-phosphate receptor Ca²⁺ channel by ligand tuning of Ca²⁺ inhibition. *PNAS* 95: 15821-15825.
- Marchant, J.S. & Taylor, C.W. (1998) Rapid activation and partial inactivation of inositol trisphosphate receptors by inositol trisphosphate. *Biochemistry* 37:33, 11524-11533.
- Marhl, M., Schuster, S., Brumen, M. & Heinrich, R. (1997) Modelling the interrelations between calcium oscillations and ER membrane potential oscillations. *Biophys. Chem.* 63: 221-239.
- Marks, A.R. (1996) Cellular Functions of Immunophilins. *Physiol. Rev.* 76:3, 631-649.
- Martin, G.V., Yun, Y. & Conforti, L. (2012) Modulation of T cell activation by localized K⁺ accumulation at the immunological synapse – A mathematical model. *J. Theor. Biol.* 300: 173-182.
- Matteson, D.R. & Deutsch, C. (1984) K channels in T lymphocytes: a patch clamp study using monoclonal antibody adhesion. *Nature* 307:5950, 468-471.
- McCaffrey, P.G., Perrino, B.A., Soderling, T.R. & Rao, A. (1993) NF-AT_p, a T Lymphocyte DNA-binding Protein That Is a Target for Calcineurin and Immunosuppressive Drugs. *J. Biol. Chem.* 268:5, 3747-3752.

- McCarl, C.-A., Picard, C., Khalil, S., Kawasaki, T., Röther, J., Papolos, A., Kutok, J., Hivroz, C., Le Deist, F., Plogmann, K., Ehl, S., Notheis, G., Albert, M.H., Belohradsky, B.H., Kirschner, J., Rao, A., Fischer, A. & Feske, S. (2009) ORAI1 deficiency and lack of store-operated Ca^{2+} entry cause immunodeficiency, myopathy and ectodermal dysplasia. *J. Allergy Clin. Immunol.* 124:6, 1311-1318.
- McCarl, C.-A., Khalil, S., Ma, J., Oh-hora, M., Yamashita, M., Roether, J., Kawasaki, T., Jairaman, A., Sasaki, Y., Prakriya, M. & Feske, S. (2010) Store-operated Ca^{2+} entry through ORAI1 is critical for T cell mediated autoimmunity and allograft rejection. *J. Immunol.* 185:10, 5845-5858.
- Means, S., Smith, A.J., Shepherd, J., Shadid, J., Fowler, J., Wojcikiewicz, R.J.H., Mazel, T., Smith, G.D. & Wilson, B.S. (2006) Reaction Diffusion Modeling of Calcium Dynamics with Realistic ER Geometry. *Biophys. J.* 91: 537-557.
- Mebius, R.E. & Kraal, G. (2005) Structure and function of the spleen. *Nat. Rev. Immunol.* 5:8, 606-616.
- Medzhitov, R. (2007) Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449:7164, 819-826.
- Merritt, J.E., Armstrong, W.P., Benhamn, C.D., Hallam, T.J., Jacob, R., Jaxa-Chamiec, A., Leigh, B.K., McCarthy, S.A., Moores, K.E. & Rink, T.J. (1990) SK&F 96365, a novel inhibitor of receptor-mediated calcium entry. *Biochem. J.* 271: 515-522.
- Meyer, T., Holowka, D. & Stryer, L. (1988) Highly Cooperative Opening of Calcium Channels by Inositol 1,4,5-Trisphosphate. *Science* 240: 4852, 653-656.
- Meyer, T. & Stryer, L. (1988) Molecular model for receptor-stimulated calcium spiking. *PNAS* 85: 5051-5055.
- Meyer, T., Wensel, T., Stryer, L. (1990) Kinetics of calcium channel opening by inositol 1,4,5-trisphosphate. *Biochemistry* 29: 32-37.
- Meyer-Hermann, M.E. (2007) The Electrophysiology of the β -Cell Based on Single Transmembrane Protein Characteristics. *Biophys. J.* 93: 2952-2968.
- Michal, G. (Hrsg.) (1999) Biochemical Pathways, Biochemie-Atlas. Spektrum Akademischer Verlag GmbH. Heidelberg, Berlin.
- Mogami, H., Gardner, J., Gerasimenko, O.V., Camello, P., Petersen, O.H. & Tepikin, A.V. (1999) Calcium binding capacity of the cytosol and endoplasmic reticulum of mouse pancreatic acinar cells. *J. Physiol.* 518:2, 463-467.

- Negulescu, P.A., Krasieva, T.B., Khan, A., Kerschbaum, H.H. & Cahalan, M. (1996) Polarity of T Cell Shape, Motility, and Sensitivity to Antigen. *Immunity* 4:5, 421-430.
- Neher, E. & Sakmann, B. (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260:5554, 799-802.
- Nilius, B., Prenen, J., Droogman, G., Voets, T., Venneskens, R., Freichel, M., Wissenbach, U. & Flockerzi, V. (2003) Voltage Dependence of the Ca^{2+} -activated Cation Channel TRPM4. *J. Biol. Chem.* 278:33, 30813-30820.
- Nilius, B., Talavera, K., Owsianik, G., Prenen, J., Droogmans, G. & Voets, T. (2005) Gating of TRP channels: a voltage connection? *J. Physiol.* 567:1, 35-44.
- Parekh, A. & Putney, J.W. (2005) Store-Operated Calcium Channels. *Physiol. Rev.* 85: 757-810.
- Parekh, A.B. (2010) Store-operated CRAC channels: function in health and disease. *Nat. Rev. Drug Discovery* 9:5, 399-410.
- Parkin, J. & Cohen, B. (2001) An overview of the immune system. *Lancet* 357: 1777-1789.
- Partiseti, M., Le Deist, F., Hivroz, C., Fischer, A., Korn, H. & Choquet, D. (1994) The Calcium Current Activated by T Cell Receptor and Store Depletion in Human Lymphocytes Is Absent in a Primary Immunodeficiency. *J. Biol. Chem.* 269:51, 32327-32335.
- Pearce, F.L. (1985) Calcium and mast cell activation. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 20: 267-274.
- Penner, R. & Neher, E. (1988) The role of calcium in stimulus-secretion coupling in excitable and non-excitable cells. *J. Exp. Biol.* 139, 329-345.
- Persechini, A. & Cronk, B. (1999) The Relationship between the Free Concentrations of Ca^{2+} and Ca^{2+} -calmodulin in Intact Cells. *J. Biol. Chem.* 274:1, 6827-6830.
- Plattner, H. & Klauke (2001) Calcium in ciliated prozoa: Sources, regulation, and calcium-regulated cell functions. *Int. Rev. Cyt.* 201: 115-208.
- Plattner, H. & Verkhratsky, A. (2013) Ca^{2+} signalling early in evolution – all but primitive. *J. Cell. Sci.* 126: 2141-2150
- Prakriya, M. & Lewis, R.S. (2001) Potentiation and inhibition of Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channels by 2-aminoethyldiphenyl borate (2-APB) occurs independently of IP_3 receptors. *J. Physiol.* 536:1, 3-19.

- Prakriya, M. & Lewis, R.S. (2002) Separation and Characterization of Currents through Store-operated CRAC Channels and Mg^{2+} -inhibited Cation (MIC) Channels. *J. Gen. Physiol.* 119:5, 487-507.
- Putney, J.W. (1986) A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 7: 1-12.
- Putney, J.W. (1990) Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* 11: 611-624.
- Putney, J.W. & Bird, G.S. (1993) The signal for capacitative calcium entry. *Cell* 75:2, 199-201.
- Putney, J.W. (2001) Pharmacology of capacitative calcium entry. *Mol. Interv.* 1:2, 84-94.
- Quintana, A., Schwarz, E.C., Schwindling, C., Lipp, P., Kaestner, L. & Hoth, M (2006) Sustained Activity of Calcium Release-activated Calcium Channels Requires Translocation of Mitochondria to the Plasma Membrane. *J. Biol. Chem.* 281: 40302-40309.
- Quintana, A., Pasche, M., Junker, C., Al-Ansary, D., Rieger, H., Kummerow, C., Nunez, L., Villalobos, C., Meraner, P., Becherer, U., Rettig, J., Niemeyer, B.A. & Hoth, M. (2011) Calcium microdomains at the immunological synapse: how ORAI channels, mitochondria and calcium pumps generate local calcium signals for efficient T-cell activation. *EMBO J.* 30: 3895-3912.
- Rahman, T.-U., Skupin, A., Falcke, M. & Taylor, C.W. (2009) Clustering of IP_3 receptors by IP_3 retunes their regulation by IP_3 and Ca^{2+} . *Nature.* 458: 655-659.
- Rahman, T.-U. & Taylor, C.W. (2010) Nuclear patch-clamp recording from inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Methods Cell Biol.* 99: 199-224.
- Rakowski, R.F., Bezanilla, F., De Weer, P., Gadsby, D.C., Holmgren, M. & Wagg, J. (1997) Charge translocation by the Na/K pump. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 834: 231-243.
- Rasmussen, H. (1961) Parathyroid hormone. Nature and mechanism of action. *Am. J. Med.* 30: 112-128.
- Ringer, S. (1883) A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart. *J. Physiol.* 4:1, 29-42.3.
- Rizzuto, R., Marchi, S., Bonora, M., Aguiari, P., Bononi, A., De Stefani, D., Giorgi, C., Leo, S., Rimessi, A., Siviero, R., Zecchini, E. & Pinton, P. (2009) Ca^{2+} transfer from the ER to mitochondria: when, how and why. *Biochim. Biophys. Acta* 1787:11, 1342-1351.

- Romani, L. (2004) Immunity to fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.* 4:1, 1-23.
- Rorsman, P. (2005) Insulin secretion: function and therapy of pancreatic beta-cells in diabetes. *Br. J. Diab. Vasc. Disease* 5:4, 187-191.
- Sagan, I. (1967) On the Origin of mitosing Cells. *J. Theor. Biol.* 14: 225-274.
- Sanchez, E.J., Lewis, K.M., Danna, B.R. & Kang, C. (2012) High-capacity Ca^{2+} binding of human skeletal calsequestrin. *J. Biol. Chem.* 287:14, 11592-11601.
- Schmeitz, C., Hernandez-Vargas, E.A., Fliegert, R., Guse, A.H. & Meyer-Hermann, M. (2013) A mathematical model of T lymphocyte calcium dynamics derived from single transmembrane protein properties. *Front. Immunol.* 4:277, 1-16.
- Schuster, S., Mahrl, M. & Höfer, T. (2002) Modelling of simple and complex calcium oscillations. *Eur. J. Biochem.* 269:5, 1333-1355.
- Schwarz, E.C., Qu, B. & Hoth, M. (2013) Calcium, cancer and killing: The role of calcium in killing cancer cells by cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1833:7, 1603-1611.
- Schwarzmann, N., Kunerth, S., Weber, K., Mayr, G.W. & Guse, A.H. (2002) Knockdown of the type 3 ryanodine receptor impairs sustained Ca^{2+} signaling via the T cell receptor/CD3 complex. *J. Biol. Chem.* 277: 50636-50642.
- Severini, A., Prasad, K.V., Almeida, A.F. & Kaplan, J.G. (1987) Regulation of the number of Na^+ , K^+ -pump sites after mitogenic activation of lymphocytes. *Biochem. Cell. Biol.* 65:2, 95-104.
- Shen, W.-W., Frieden, M. & Demaurex, N. (2011) Remodelling of the endoplasmic reticulum during store-operated calcium entry. *Biol. Cell* 103:8, 365-380.
- Sherman, A., Rinzel, J. & Keizer, J. (1988) Emergence of organized bursting in clusters of pancreatic beta-cells by channel sharing. *Biophys. J.* 54:3, 411-425.
- Shiina, T., Hosomichi, K., Inoko, H. & Kulski, J.K. (2009) The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. *J. Hum. Genet.* 54:1, 15-39.
- Shumilina, E., Huber, S.M., Lang, F. (2011) Ca^{2+} signaling in the regulation of dendritic cell functions. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 300: 1205-1214.
- Singh, A., Hildebrand, M.E., Garcia, E. & Snutch, T.P. (2010) The transient receptor potential channel antagonist SKF96365 is a potent blocker of low-voltage-activated T-type calcium channels. *Br. J. Pharmacol.* 160:6, 1464-1475.

- Sneyd, J. & Falcke, M. (2005) Models of the inositol trisphosphate receptor. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 98:3, 207-245.
- Steinman, R.M. (1991) The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* 9: 271-296.
- Storb, R., Antin, J.H. & Cutler, C. (2010) Should methotrexate plus calcineurin inhibitors be considered standard of care for prophylaxis of acute graft-versus-host disease? *Biol. Blood Marrow Transplant.* 16: 18-27.
- Storn, R. & Price, K. (1997) Differential evolution – a simple and efficient heuristic for global optimization over continuous spaces. *J. Glob. Opt.* 11: 341-359.
- Stokes, L., Gordon, J. & Gillian, G. (2004) Non-voltage-gated L-type Ca^{2+} Channels in Human T Cells: Pharmacology and molecular characterization of the major α Pore-Forming and auxiliary β -subunits. *J. Biol. Chem.* 278: 19566-19573.
- Streb, H., Heslop, J.P., Irvine, R.F., Schulz, I. & Berridge, M.J. (1985) Relationship between Secretagogue-induced Ca^{2+} Release and Inositol Polyphosphate Production in Permeabilized Pancreatic Acinar Cells. *J. Biol. Chem.* 260:12, 7309-7315.
- Su, Z., Guo, X., Barker, D.S., Shoemaker, R.L., Marchase, R.B. & Blalock, J.E. (2005) A Store-Operated Nonselective Cation Channel in Human Lymphocytes. *Cell. Mol. Neurobiol.* 25:3-4, 625-647.
- Takemura, H., Hughes, A.R., Thastrup, O. & Putney, J.W (1989) Activation of Calcium Entry by the Tumor Promotor Thapsigargin in Parotid Acinar Cells. *J. Biol. Chem.* 264:21, 12266-12271.
- Takezawa, R., Cheng, H., Beck, A. Ishikawa, J., Launay, P., Kubota, H., Kinet, J.P., Fleig, A., Yamada, T. & Penner, R. (2006) A pyrazole derivative potently inhibits lymphocyte Ca^{2+} influx and cytokine production by facilitating transient receptor potential melastatin 4 channel activity. *Mol. Pharmacol.* 69:4, 1413-1420.
- Tansey, M.G., Luby-Phelps, K., Kamm, K.E. & Stull, J.T. (1994) Ca^{2+} -dependent phosphorylation of myosin light chain kinase decreases the Ca^{2+} sensitivity of light chain phosphorylation within smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 269:13, 9912-9920.
- Taylor, C.W., Prole, D.L. & Rahman, T. (2009) Ca^{2+} Channels on the Move. *Biochem.* 48: 12062-12080.
- Taylor, C.W. & Tovey, S.C. (2010) IP_3 receptors: toward understanding their activation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2:12, a004010.

Taylor, C. & Dale, P. (2012) Intracellular Ca^{2+} channels – a growing community. *Mol. Cell Endocrinol.* 353: 21-28.

Taylor, E.N. & Curhan, G.C. (2013) Dietary calcium from dairy and nondairy sources, and risk of symptomatic kidney stones. *J. Urol.* 190:4, 1255-1259.

Tilney, N.L., Milford, E.L., Araujo, J.L., Strom, T.B., Carpenter, C.B. & Kirkman, R.L. (1984) Experience with cyclosporine and steroids in clinical renal transplantation. *Ann. Surg.* 200:5, 605-613.

Trevillyan, J.M., Chiou, X.G., Chen, Y.W., Ballaron, S.J., Sheets, M.P., Smith, M.L., Wiedeman, P.E., Warrior, U., Wilkins, J., Gubbins, E.J., Gagne, G.D., Fagerland, J. Carter, G.W., Luly, J.R., Mollison, K.W. & Djuric, S.W. (2001) Potent inhibition of NFAT activation and t cell cytokine production by novel low molecular weight pyrazole compounds. *J. Biol. Chem.* 276:51, 48118-48126.

Tsien, R.Y., Pozzan, T. & Rink, T.J. (1982a) T-cell mitogens cause early changes in cytoplasmic free Ca^{2+} and membrane potential in lymphocytes. *Nature* 295: 68-71.

Valeyev, N.V., Bates, D.G., Heslop-Harrison, P., Postlethwaite, I. & Kotov, N. (2008) Elucidating the mechanisms of cooperative calcium-calmodulin interactions: a structural systems biology approach. *BMC Syst. Biol.* 2:48.

Vandecaetsbeek, I., Vangheluwe, P., Raeymaekers, L., Wuytack, F. & Vanoevelen, J. (2011) The Ca^{2+} pumps of the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3:5, a004184.

Verheugen, J., Vijverberg, H., Oortgiesen, M. & Cahalan, M. (1995) Voltage-gated and Ca^{2+} -activated K^{+} channels in intact human T lymphocytes. Noninvasive measurements of membrane currents, membrane potential and intracellular calcium. *J. Gen. Physiol.* 105: 765-794.

Wakabayashi, T. & Ebashi, S. (1968) Reversible Change in Physical State of Troponin Induced by Calcium Ion. *J. Biochem.* 64:5, 731-732.

Wakui, M., Potter, B.V.L. & Petersen, O.H. (1989) Pulsatile intracellular calcium release does not depend on fluctuations in inositol trisphosphate concentration. *Nature* 339: 317-320.

Weiss, A., Imboden, J., Shoback, D. & Stobo, J. (1984) Role of T3 surface molecules in human T-cell activation: T3-dependent activation results in an increase in cytoplasmic free calcium. *PNAS* 81: 4169-4173.

- Whitfield, J.F., Perris, A.D. & Youdale, T. (1968) The role of calcium in the mitotic stimulation of rat thymocytes by detergents, agmatine and poly-L-lysine. *Exp. Cell. Res.* 53: 155-165.
- Williams, G.S.B., Chikando, A.C., Tuan, H.-T.M., Sobie, E.A., Lederer, W.J. & Jafri, M.S. (2011) Dynamics of Calcium Sparks and Calcium Leak in the Heart. *Biophys. J.* 101:1287-1296.
- Wu, M.M., Buchanan, J., Luik, R.M. & Lewis, R.S. (2006) Ca^{2+} store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 174:6, 803-813.
- Wu, G., Xie, X., Lu, Z.H. & Ledeen, R.W. (2009) Sodium-calcium exchanger complexed with GM1 ganglioside in nuclear membrane transfers calcium from nucleoplasm to endoplasmic reticulum. *PNAS* 106:26, 10829-10834.
- Wucherpfennig, K.W., Gagnon, E., Call, M.J., Huseby, E.S. & Call, M.E. (2010) Structural Biology of the T-cell Receptor: Insights into Receptor Assembly, Ligand Recognition, and Initiation of Signaling. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 2:4, 1-22.
- Wolosker, H., Engelender, S. & Meis, L.D. (1998) Reaction mechanism of the sarkoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Adv. Mol. Cell Biol.* 23A: 1-31.
- Woods, N.W., Cuthbertson, K.S.R. & Cobbold, P.H. (1986) Repetitive transient rises in cytoplasmic free calcium in hormone-stimulated hepatocytes. *Nature* 319: 600-602.
- Wuytack, F., Papp, B., Verboomen, H., Raeymaekers, L., Dode, L., Bobe, R., Enouf, J., Bokkala, S., Authi, K.S. & Casteels, R. (1994) A sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 3-type Ca^{2+} pump is expressed in platelets, in lymphoid cells, and in mast cells. *J. Biol. Chem.* 269:2, 1410-1416.
- Zakharov, S.I., Smani, T., Dobryднева, Y., Monje, F., Fichandler, C., Blackmore, P.F. & Bolotina, V.M. (2004) Diethylstilbestrol is a potent inhibitor of store-operated channels and capacitative Ca^{2+} influx. *Mol. Pharmacol.* 66:3, 702-707.
- Zhang, S.L., Yu, Y., Roos, J., Kozak, J.A., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H., Stauderman, K.A. & Cahalan, M.D. (2005) STIM1 is a Ca^{2+} sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca^{2+} store to the plasma membrane. *Nature* 437:7060, 902-905.
- Zhang, N. & Bevan, M.J. (2011) CD8^{+} T Cells: Foot Soldiers of the Immune System. *Immunity*. 35:2, 161-168.

Zinkernagel, R.M. & Doherty, P.C. (1974) Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature* 251:5475, 547-548.

Zinkernagel, R.M., & Doherty, P.C. (2004) Pillars Article: Immunological Surveillance against Altered Self Components by Sensitised T Lymphocytes in Lymphocytic Choriomeningitis. *Nature* 251: 547-548.

Zitt, C., Strauss, B., Schwarz, E.C., Spaeth, N., Rast, G., Hatzelmann, A & Hoth, M. (2004) Potent inhibition of Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channels and T-lymphocyte activation by the pyrazole derivative BTP2. *J. Biol. Chem.* 279:13, 12427-12437.

Zweifach, A. & Lewis R.S. (1993) Mitogen-regulated Ca^{2+} current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca^{2+} stores. *PNAS* 90:13, 6295-6299.

Zweifach, A. & Lewis, R.S. (1995a) Rapid inactivation of Depletion-activated Calcium Current (I_{CRAC}) Due to Local Calcium Feedback. *J. Gen. Physiol.* 105:2, 209-226.

Zweifach, A. & Lewis, R.S. (1995b) Slow calcium-dependent inactivation of depletion-activated calcium current. Store-dependent and -independent mechanisms. *J. Biol. Chem.* 270:24, 14445-14451.

Żylińska, L. & Soszyński, M. (2000) Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in excitable and nonexcitable cells. *Acta Biochim. Pol.* 47:3, 529-539.

VIII ABBILDUNGSVERZEICHNIS

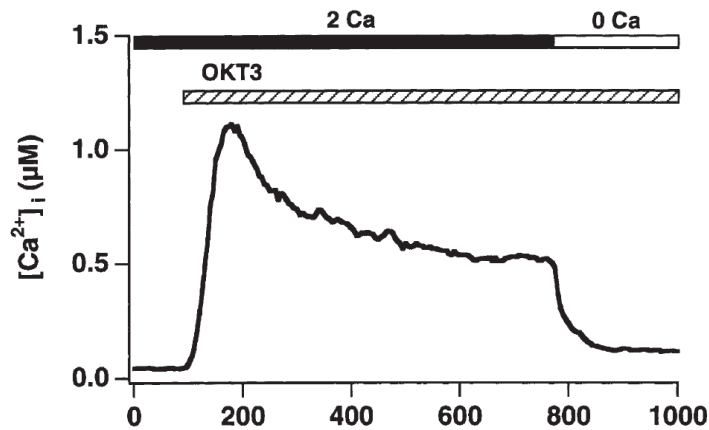
| | |
|-----------------|--|
| Abb. 1 | „Store-Operated Calcium Entry“ (SOCE) |
| Abb. 2 | Calcium-Oszillationen in der T-Zelle |
| Abb. 3 | Abhängigkeit der Calcium-Oszillationen von Thapsigargin |
| Abb. 4 | Biphasisches Calciumsignal |
| Abb. 5 | Schema der T-Zelle als Grundlage des Modells |
| Abb. 6 | Aktivierung und Inaktivierung des IP_3R in Abhängigkeit von Calcium und IP_3 |
| Abb. 7A | Calciumdynamik im Modell |
| Abb. 7B | Calciumströme im Modell |
| Abb. 7C | Calciumströme durch einzelne Kanäle im Modell |
| Abb. 7D | CRAC-Dichte im Modell |
| Abb. 8A | Calciumdynamik ohne extrazelluläres Calcium im Modell |
| Abb. 8B | Calciumströme ohne extrazelluläres Calcium im Modell |
| Abb. 9A | Calciumdynamik unter Blockierung der SERCA im Modell |
| Abb. 9B | CRAC-Dichte unter Blockierung der SERCA im Modell |
| Abb. 10A | Calciumdynamik unter PMCA- und SERCA-Blockierung im Modell |
| Abb. 10B | Calciumströme unter PMCA- und SERCA-Blockierung im Modell |
| Abb. 11 | CRAC-Dichte bei gleichzeitiger PMCA-Blockierung im Modell |
| Abb. 12 | Cyclosporin A |

IX ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|------------------------|--|
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| SOCE | „Store-Operated Calcium Entry“ |
| CICR | „Calcium-Induced Calcium Release“ (CICR) |
| TCR | „T-Cell Receptor“ |
| PLC | Phospholipase C |
| PIP₂ | Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat |
| IP₃ | Inositol-1,4,5-Trisphosphat |
| DAG | Diacylglycerol |
| cADPR | zyklische ADP-Ribose |
| NAADP | Nikotinsäureadenindinukleotidphosphat |
| IP₃R | Inositoltrisphosphat-Rezeptor |
| STIM1 | „Stromal Interaction Molecule“ |
| CRAC | „Calcium-Release Activated Channel“ |
| Cal | Calmodulin |
| Cne | Calcineurin |
| NFAT | „Nuclear Factor of Activated T-cells“ |
| SERCA | Sarkoendoplasmatische Retikulum-Calcium-ATPase |
| PMCA | Plasmamembran-Calcium-ATPase |
| TRP | „Transient Receptor Potential Melastatin“ |
| TG | Thapsigargin |
| CsA | Cyclosporin A |
| CyPA | Cyclophilin A |
| ATP | Adenosintriphosphat |

X ANHANG

Zu Kapitel IV, 1.1:

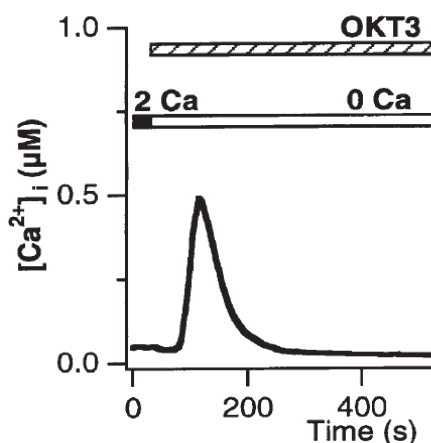


Bautista et al., 2002; Abbildung 1a
Biphasisches Calciumsignal

Eine Jurkat-T-Zelle wird in Gegenwart einer 2 mM-Calciumlösung mit dem monoklonalen Antikörper OKT stimuliert.

Es resultiert das charakteristische biphasische Calciumsignal mit einem cytosolischen Calciumpeak von 1,17 μM und einer Plateauphase bei einer Calciumkonzentration von 0,8 μM .

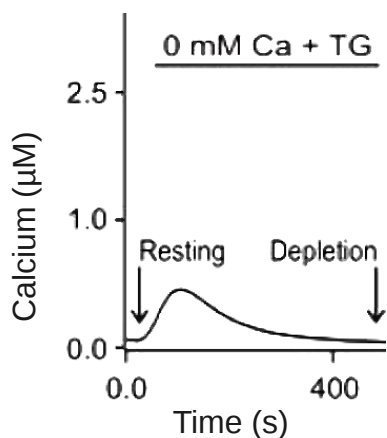
Zu Kapitel IV, 1.2:



Bautista et al., 2002; Ausschnitt aus Abbildung 2a
Calciumpeak durch CICR

Für die vorliegende Arbeit ist dabei nur der erste Teil der Graphik (bis 400 s) relevant.

Eine Jurkat-T-Zelle wird in Gegenwart einer calciumfreien Lösung mit dem monoklonalen Antikörper OKT stimuliert. Es resultiert ein kleiner cytosolischer Calciumpeak mit einer Amplitude von 0,5 μM . Eine Plateauphase besteht nicht.

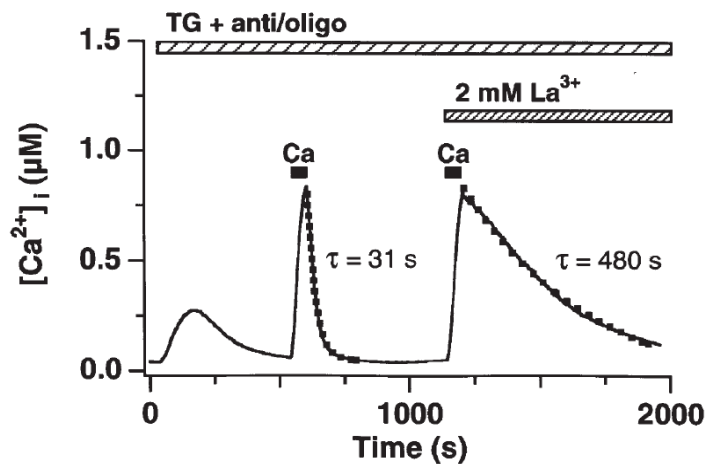


Quintana et al., 2006; Ausschnitt aus Abbildung 1a
Calciumpeak durch CICR

Für die vorliegende Arbeit ist dabei nur der erste Teil der Graphik (bis 400 s) relevant.

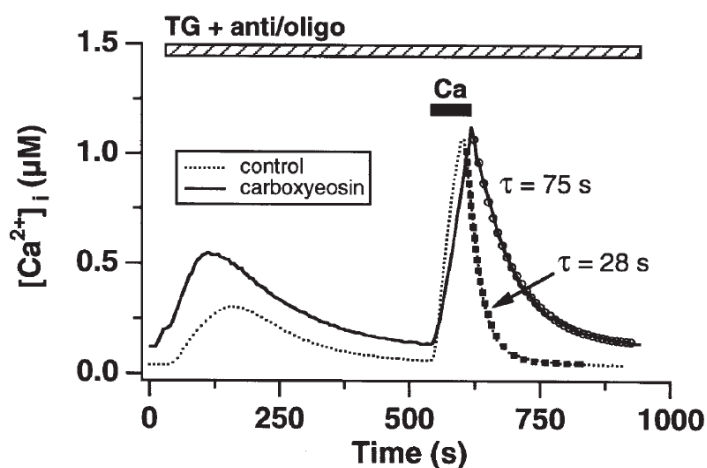
Eine Jurkat-T-Zelle wird in Gegenwart einer calciumfreien Lösung mit dem SERCA-Antagonisten Thapsigargin (TG) stimuliert, so dass der ER-Calciumspeicher entleert wird. Es resultiert ein niedriger, flacher cytosolischer Calciumpeak mit einer Amplitude von 0,5 μM . Eine Plateauphase besteht nicht.

Zu Kapitel IV, 1.3:



Bautista et al., 2002; Abbildung 6c
CRAC-Blockade mit La^{3+}

Durch Thapsigargin (TG) wird der ER-Calciumspeicher einer Jurkat-T-Zelle, die sich in calciumfreier Lösung befindet, geleert. Kurzfristig wird extrazelluläres Calcium zugegeben, so dass ein Calciumpeak resultiert, der durch die PMCA wieder abgesenkt wird (erster Peak). Bei blockierter PMCA erfolgt die Senkung der angestiegenen Calciumkonzentration (zweiter Peak) deutlich langsamer.



Bautista et al., 2002; Abbildung 6d
CRAC-Blockade mit Carboxyeosin

Der ER-Calciumspeicher einer Jurkat-T-Zelle wird geleert und kurzfristig wird extrazelluläres Calcium zugegeben. Der resultierende Calciumpeak wird im Kontrollexperiment durch die PMCA abgesenkt. Im Vergleichsexperiment mit blockierter PMCA ist die Zeitkonstante deutlich größer. Das verwendete Carboxyeosin inhibiert im Gegensatz zu La^{3+} nicht den CRAC.